DIE FUNKTION DER HEXOKINASE PII BEI DER GLUCOSE–REPRESSION IN DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Kai-Uwe Fröhlich

aus Hannover

1984

DIE FUNKTION DER HEXOKINASE PII BEI DER GLUCOSE–REPRESSION IN DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Kai-Uwe Fröhlich

aus Hannover

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	13.7.1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weber

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für sein Interesse und die intensive Förderung meiner Arbeit. Die Diskussionen mit ihm gaben mir fruchtbare Anregungen.

Besonders möchte ich Herrn Dr. K.-D. Entian für die gute Betreuung und viele wertvolle Ratschläge danken.

Bei meinen Laborkollegen bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Dem Leiter der Institutswerkstatt, Herrn E. Eichele, und seinen Mitarbeitern danke ich für die Anfertigung vieler wichtiger Geräte.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536524_0011

für Ellen

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1. 1.	Mechanismen der Stoffwechselregulation	1
1. 2.	Glucose-Repression in Saccharomyces cerevisiae	3
1. 3.	Hexokinaseisoenzymformen in Saccharomyces cerevisiae	8
1. 4.	Genetische und molekularbiologische Arbeitsmethoden bei Saccharomyces cerevisiae	12
1. 5.	Aufgabenstellung	15
2.	Material und Methoden	17
2. 1.	Verwendete Stämme	17
2. 2.	Kulturmedien	18
2. 3.	Chemikalien	19
2. 4.	Puffer	19
2. 5.	Genetische Methoden	20
2. 6.	Zellanzucht und Rohextraktgewinnung	21
2. 7.	Protein- und Enzymbestimmungen	21
2. 8.	Elektrophoretische Methoden	24
2. 9.	Elution von DNA aus Elektrophoresegelen	27
2.10.	Isolierung von Plasmiden und chromosomaler DNA	28
2.11.	Restriktionsverdau und Ligation von DNA	31
2.12.	Phosphatabspaltung und Markierung von 5'-Enden der DNA	31
2.13.	Synthese von gamma^{32}P-ATP	33
2.14.	Plasmidtransformation in Escherichia coli	34
2.15.	Plasmidtransformation in Saccharomyces cerevisiae	34
2.16.	DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung nach Southern	36
2.17.	Basenspezifische Spaltungen nach Maxam und Gilbert	37
3.	Ergebnisse	40
3. 1.	Isolierung und Charakterisierung der hex1^{r}-Mutanten	40
3. 2.	Allelietest der hex1^{r}-Mutanten	44
3. 3.	Klonieren des Strukturgens der Hexokinase PII	49
3. 3.1	Selektion der HXK2-Klone	49

3. 3.2 Biochemische Charakterisierung der Klone 51
3. 3.3 Reklonieren der isolierten Plasmide 53
3. 4. Southern-Transfer und Southern-Hybridisierung 56
3. 5. Restriktionskartierung der Plasmide YRp/HXK2-1 und YRp/HXK2-2 60
3. 6. Subklonieren des HXK2-Gens 62
3. 7. Klonieren des HXK1-Gens 64
3. 8. Birnstiel-mapping des HXK2-3 Inserts 66
3. 8.1 Strategie des Birnstiel-mapping 66
3. 8.2 Synthese von gamma^{32}P-ATP 67
3. 8.3 Markieren der DNA 69
3. 8.4 Durchführung des Birnstiel-mapping 70
3. 9. Sequenzieren nach Maxam und Gilbert 72
3. 9.1 Konstruktion des Plasmids YRp/HXK2-8 72
3. 9.2 Isolierung der Inserts von YRp/HXK2-3 und YRp/HXK2-8 72
3. 9.3 Prinzip und Durchführung der Sequenzierung nach Maxam und Gilbert 73
3. 9.4 Auswertung der Sequenziergele 81
3.10. Lokalisieren des HXK2-Gens 82
3.11. Die selektive Benutzung des Triplettcodes im HXK2-Gen 90

4. Diskussion 93
4. 1. Regulation der Glucose-Repression in Saccharomyces cerevisiae 93
4. 2. Gentechnologie in Saccharomyces cerevisiae 97
4. 3. Die Basensequenz des HXK2-Gens 98
4. 4. Codonselektivität der Hexokinase 99

5. Zusammenfassung 102

6. Literaturverzeichnis 104

Abkürzungen:

A	Adeninrest
BAP	Bakterielle alkalische Phosphatase
b.d.	unter der Nachweisgrenze (below detection)
Bp	DNA-Basenpaare
C	Cytosinrest
CIP	Phosphatase aus Kälberdarm
CRP	cAMP Rezeptorprotein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonsäure
G	Guaninrest
kBp	kilo DNA-Basenpaare (1000 Bp)
MDH	Malat Dehydrogenase
MTT	3(4,5-Dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
OD	Optische Dichte
Q F/G	relative Phosphorylierungsaktivität mit Fructose : Glucose
Rf	Verhältnis Laufstrecke : Laufmittelfront
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thyminrest
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
YEP	1% Hefeextrakt, 2% Bacto Pepton

1. Einleitung

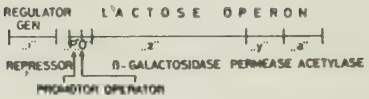
1. 1. Mechanismen der Stoffwechselregulation

Für jeden Organismus ist es von grundlegender Bedeutung, seinen Stoffwechsel optimal an das umgebende Milieu anzupassen. Eine herausragende Bedeutung hat dabei die Anpassung an die zur Verfügung stehende Kohlenstoff-Quelle. Für diese Adaptation haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, die alle die Umsatzrate bestimmter Enzyme und Aufnahmesysteme beeinflussen. Dabei sind meist nicht alle Enzyme eines Stoffwechselwegs betroffen, sondern nur die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte.

Zur kurzzeitigen Umstellung des Stoffwechsels dient die Regulation der katalytischen Aktivität durch Stoffwechselmetabolite oder die entsprechenden Substrate. Die dadurch bewirkte Aktivierung oder Hemmung ist reversibel.

Mittelfristig können Enzyme durch kovalente Modifikation, z. B. Phosphorylierung, und durch Proteolyse inaktiviert werden. Die kovalente Veränderung kann reversibel sein und als Vorbereitung für den irreversiblen proteolytischen Abbau dienen.

Die langfristige Umstellung des Zellstoffwechsels erfolgt auf der Ebene der Transskription. Die Synthese bestimmter mRNAs wird durch Repression verhindert bzw. durch Induktion veranlaßt. Besonders genau ist die Steuerung dieses Mechanismus bei Prokaryonten untersucht. Dort liegen häufig mehrere Gene eines Stoffwechselweges hintereinander (sog. Gencluster) hinter einer Regulatorsequenz, so daß sie gemeinsam induziert bzw. reprimiert werden können (Operon). Typisches und bestuntersuchtes Beispiel ist das lac-Operon von Escherichia coli (Abb. 1).



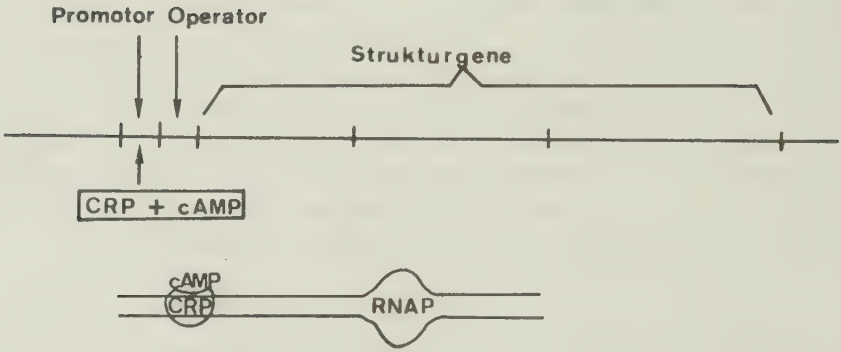


Abb. 1: Aufbau des lac-Operons
Ein vom i-Gen codierter Repressor verhindert die Transkription durch Bindung am Operator. Allolactose als Induktor verhindert dies durch eine Konformationsänderung des Repressors (negative Regulation). Ein cAMP-CRP-Komplex erleichtert der RNA-Polymerase die Bindung an den Promotor. Glucose senkt den cAMP-Spiegel und vermindert die Transkriptionsrate (Glucose-Repression).

Das lac-Operon besteht aus drei Strukturgenen, die für Enzyme der Lactoseverwertung codieren, und einer Regulatorregion, die aus Operator und Promotor besteht. Die Transkription der Strukturgene wird durch Lactose induziert. Glucose im Medium verhindert jedoch diese Induktion (Katabolitrepression). Als Angriffspunkt für die Repression stellte sich ein vor dem Operator, der die Genindukti-on ermöglicht, liegender Bereich heraus, der Promotor (Pastan und Perlman, 1968; Tyler und Magasanik, 1969; Yudkin, 1969; Perlman et al., 1969; Silverstone et al., 1969). Makman und Sutherland (1965) fanden, daß dereprimierte Zellen einen höheren cAMP-Spie-

gel als mit Glucose angezogene Zellen haben. Zugabe von Glucose hob die Repression der Galaktokinase auf (Pastan und Perlman, 1969; Ullman und Monod, 1968; Perlman und Pastan, 1968; Chambers und Zubay, 1969). Loomis und Magasanik (1965) und Tyler et al. (1969) beschrieben eine Mutante, die nicht mehr dereprimieren konnte. Die Mutation lag im Strukturgen des sog. "cAMP receptor proteins". Dies Protein bildet mit cAMP einen Komplex, der einen GC-reichen Bereich des Promotors destabilisiert und so der RNA-Polymerase den Angriff auf die benachbarte AT-reiche Region ermöglicht (Dickson et al., 1975). Von dort wandert die Polymerase zur Bindungsstelle, wo sie einen festen Komplex mit der DNA bildet. Diese Bindungsstelle, die ca. 10 Nucleotide vor dem Transkriptionsbeginn liegt, hat in allen untersuchten Pro- und Eukaryonten eine sehr ähnliche Sequenz, etwa 5'-TATAAT-3' bezogen auf den nicht transkribierten Strang (Pribnow, 1975; Schaller et al. 1975).

1.2. Glucose-Repression in Saccharomyces cerevisiae

Zur Untersuchung der Regulation von Enzymrepression und -induktion in Eukaryonten bietet sich die Kulturhefe Saccharomyces cerevisiae als Modellorganismus an. Sie ist leicht zu kultivieren, hat eine kurze Generationsdauer, ist ideal für genetische Manipulationen und ermöglicht außerdem das Klonieren einzelner Gene in hybriden Hefe/E. coli-Plasmiden.

Die Abhängigkeit der Aktivität einer Reihe von Enzymen von der angebotenen Kohlenstoffquelle wurde bei Saccharomyces cerevisiae zuerst von Spiegelman und Reiner (1947) beschrieben. Sie beobachteten, daß Zugabe von Glucose zum Medium die Galaktozymase reprimiert. Durch Glucose werden auch die Atmungsenzyme (Swanson und Clifton, 1948; Polakis et al., 1965), die glucogenetischen Enzyme (Gancedo et al., 1965; Witt et al., 1966b; Gancedo und Schwerzmann,1976), die Enzyme des Glyoxylatzyklus und des Citratzyklus (Polakis und Bartley, 1965), die alpha-Glycosidasen (van Wijk et

al., 1969) und die Invertase (Gascón et al., 1968) reprimiert (Glucose-Repression). Von den drei Isoenzymen der Enolase, genannt Enolase I, Enolase C und Enolase II, ist nur das Isoenzym I von der Glucose-Repression betroffen (Fröhlich und Entian, 1982). Die Aktivität des Isoenzyms C, eines Hybrids aus den Monomeren der Enolasen I und II, bleibt unter allen Wachstumsbedingungen konstant. Im Gegensatz dazu wird das Isoenzym II, das in auf Ethanolmedium angezogenen Zellen reprimiert ist, durch Glucose induziert (Glucose-Induktion). Die Gesamtaktivität der Enolase bleibt dabei etwa konstant. Vermutlich setzt die Hefe das Isoenzym I in der Glucogenese und Isoenzym II in der Glykolyse ein. Die Enolase I sitzt damit als erstes spezifisches Enzym der Glucogenese an einer Schlüsselstelle der Regulation. Wie die Enolase II werden auch die glycolytischen Enzyme Pyruvat Kinase und Pyruvat Decarboxylase durch Glucose dereprimiert (Entian et al., 1984). Neben dem Anstieg der katalytischen Aktivität wurde auch eine starke Zunahme der mRNA der Pyruvat Decarboxylase festgestellt (Schmitt und Zimmermann, 1982).

Widersprüchlich sind die Ergebnisse über die Wirkung von cAMP bei der Glucose-Repression in Hefe. Van Wijk und Konijn (1971) beobachteten einen Anstieg der cAMP-Konzentration nach Glucosezugabe. Schlanderer und Dellweg (1974) stellten einen linearen Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration im Medium und dem cAMP-Spiegel fest. Mahler und Lin (1978) lösten durch cAMP-Zugabe eine Derepression der delta-Aminolävulat Dehydratase aus. Messungen an Adenylat Cyclasemutanten zeigten dagegen, daß die cAMP-Konzentration keinen Einfluß auf die Glucose-Repression der Galaktokinase hat (Matsumoto et al., 1982a; 1982b).

Im Unterschied zur Glucose-Repression konnte die Beteiligung von cAMP an der Glucose-Inaktivierung eindeutig gezeigt werden (Tortora et al., 1983). Nach Glucosezugabe werden die cytoplasmatische Malatdehydrogenase (Witt et al., 1966; Ferguson et al., 1967; Duntze et al., 1968), die Isocitrat Lyase (Duntze et al.,

1969), die Fructose 1,6-bisphosphatase (Gancedo, 1971) und die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (Gancedo et al., 1974; Haarasilta und Oura, 1975; Gancedo und Schwerzman, 1976) vollständig inaktiviert. Sinn dieses Prozesses ist es in erster Linie, einen "futile cycle" zwischen Glycolyse und Glucogenese, der zur ATP-Hydrolyse führt, zu verhindern. Während die Inaktivierung dieser Enzyme in Zellen, die exponentiell mit Ethanol als Kohlenstoffquelle gewachsen waren, erst 5 - 10 Minuten nach Glucosezugabe einsetzt, zeigt die Fructose 1,6-bisphosphatase in stationären Hefezellen ein biphasisches Inaktivierungsverhalten. Innerhalb von drei bis fünf Minuten nach Glucosezugabe sinkt die Aktivität um etwa 50% ab. Diese schnelle Inaktivierung ist reversibel (Lenz und Holzer, 1980). Setzt man die Zellen wieder auf glucosefreies Medium um, so wird die volle Aktivität auch bei blockierter Proteinbiosynthese wieder hergestellt. Auf die reversible Phase der Inaktivierung folgt die irreversible Inaktivierung wie in mit Ethanol gezogenen Zellen. In Mutantenzellen mit Ausfall der irreversiblen Inaktivierung der Malat Dehydrogenase bleibt die Inaktivierung der Fructose 1,6-bisphosphatase stets reversibel (Entian et al., 1983).

Bei der irreversiblen Inaktivierung verschwindet parallel zur Aktivität das immunologisch präzipitierbare Material, wie bei der cytoplasmatischen Malat Dehydrogenase (Hägele et al., 1978; Neeff et al., 1978), der Fructose 1,6-bisphosphatase (Funayama et al., 1980) und der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (Müller et al., 1981) gefunden wurde. Das zeigt, daß für diesen Teil der Inaktivierung eine Proteolyse verantwortlich ist. Der reversible Teil der Inaktivierung der Fructose 1,6-bisphosphatase beruht auf der Phosphorylierung eines Serinrests durch eine Proteinkinase (Müller und Holzer, 1981; Mazón et al., 1980) und dient vermutlich als Auslöser der anschließenden Proteolyse. Das immunpräzipitierbare Material nimmt in dieser Phase nicht ab (Tortora et al., 1981). Glucosegaben erhöhen die cAMP-Konzentration (Tortora et al., 1982), eventuell über eine Depolarisation der Cytoplasmamem-

bran (Mazón et al., 1982b) und zugleich die Konzentration des Fructose 2,6-bisphosphats (Lederer et al., 1981). cAMP aktiviert die Proteinkinase, die die Fructose 1,6-bisphosphatase phosphoryliert; das Fructose 2,6-bisphosphat verstärkt diesen Effekt (Mazón et al., 1982a).

Während die cytoplasmatische Malat Dehydrogenase durch Glucose im Medium inaktiviert wird, wurde angenommen, daß Glucose keinen Einfluß auf die Aktivität des mitochondrialen Isoenzyms hat. In Elektrophoresen von Rohextrakten mit anschließender Aktivitätsanfärbung stellte sich heraus, daß Glucose die Synthese der mitochondrialen Malat Dehydrogenase reprimiert (Entian et al., 1984). Die spezifische Aktivität des Isoenzyms sinkt parallel zum Zellwachstum ab. Das steht in Einklang mit der Tatsache, daß die Mitochondrien bei Glucose-Anzucht als komprimierte Promitochondrien vorliegen. Das führt dazu, daß Saccharomyces cerevisiae beim Wachstum auf Glucose keinen Pasteur Effekt zeigt, also keine höhere Zellausbeute beim aeroben im Gegensatz zum anaeroben Wachstum (Pasteur 1876, Warburg, 1926), da Saccharomyces cerevisiae auch in Anwesenheit von Sauerstoff Glucose bevorzugt vergärt (Lagunas, 1979; 1981). Erst nach Glucoseverbrauch wird das entstandene Ethanol veratmet. Es handelt sich hier also um ein diauxisches Wachstum. Nur ausgehungerte Zellen von Saccharomyces cerevisiae zeigen einen Pasteureffekt (Meyerhof, 1925; Lynen et al., 1959; Holzer et al., 1955; Salas et al., 1965; Lagunas et al., 1982; Lagunas und Gancedo, 1983).

Die ersten Mutanten mit Ausfall der Glucose-Repression wurden von Montenecourt et al. (1973) und Schamhart et al. (1975) beschrieben; die Ursache des Ausfalls wurde aber nicht untersucht. Ciriacy (1978) isolierte dominante Mutanten mit vollständigem Repressionsausfall der Succinat Dehydrogenase und der NADH Dehydrogenase. Auch bei diesen Mutanten konnte der Mechanismus nicht geklärt werden.

Zimmermann und Scheel (1977) entwickelten ein Selektionssystem, das es ermöglichte, gezielt Mutanten mit Ausfall der Glucose-Repression zu erzeugen. Dabei wurden auf Glucosemedium angezogene Hefen auf Platten ausgestrichen, die wenig 2-Deoxyglucose neben einem hohen Überschuß an Raffinose enthielten. 2-Deoxy-D-glucose gelangt über das Glucoseaufnahmesystem in die Zelle und wird dort in 6-Stellung phosphoryliert. Das Produkt wirkt auf die Zelle toxisch, besonders durch die Veränderung der Zellwandstruktur (Heredia et al., 1964; Biely und Bauer, 1966; Biely und Bauer, 1968; Johnson, 1968; Farkas et al., 1969; Kuo und Lampen, 1972; Bieley et al., 1972; Moreno et al., 1975). Ein Überschuß von D-Glucose oder D-Fructose im Medium verdrängt die Deoxyglucose kompetitiv vom Carrier und verhindert so die Vergiftung der Zelle.

Die Selektion beruht darauf, daß die außen an der Zellwand lokalisierte Invertase der Glucose-Repression unterliegt. Nicht mutierte Hefezellen weisen daher nach Glucoseanzucht keine Invertaseaktivität auf. Auf dem Selektionsmedium nehmen sie daher 2-Deoxy-D-glucose auf und sterben. Mutanten mit Ausfall der Glucose-Repression dagegen haben eine hohe Invertaseaktivität. Sie können daher die Raffinose des Selektionsmediums hydrolysieren. Die entstehende Fructose verdrängt die Deoxyglucose am Carrier und ermöglicht den Mutanten zu überleben und zu wachsen.

Die durch dieses Selektionssystem gefundenen Mutanten konnten auf drei Gene zurückgeführt werden, hex1, hex2 und cat80. Zwei dieser Mutantenklassen weisen neben dem Repressionsausfall einen signifikanten Aktivitätsunterschied der Hexokinase im Vergleich zum Wildtyp auf (Zimmermann und Scheel, 1977; Entian et al., 1977). Das wies auf eine Beteiligung der Hexokinase bei der Glucose-Repression hin.

1.3. Hexokinaseisoenzymformen in Saccharomyces cerevisiae

Die Hefe Saccharomyces cerevisiae besitzt drei Isoenzyme, die Glucose phosphorylieren können. Die Glucokinase phosphoryliert nur Glucose (Maitra, 1970). Die beiden anderen Isoenzyme, Hexokinase PI und PII bzw. A und B, phosphorylieren außerdem D-Fructose und D-Mannose. Sie lassen sich durch ihre unterschiedliche relative Aktivität mit D-Fructose und D-Glucose als Substrat unterscheiden. Hexokinase PI phosphoryliert Fructose dreimal schneller als Glucose (Q F/G=3), für Hexokinase PII beträgt dieser Quotient 1,2. Das reine Isoenzym PI weist eine spezifische Aktivität von 140 U/mg Protein auf, PII dagegen eine von 700 U/mg. Da die Aktivität der beiden Isoenzyme im Rohextrakt etwa gleich ist, enthält die Zelle also 4 -5mal mehr Moleküle der Hexokinase PI als PII (Derechin et al., 1966).

Die beiden Hexokinaseisoenzyme werden von zwei auf verschiedenen Chromosomen liegenden Genen codiert (Mortimer und Schild, 1980; Lobo und Maitra, 1977b; Maitra und Lobo, 1983). Die serologische Ähnlichkeit der beiden Isoenzyme ist nach Womack et al. (1973) nur gering. Schmidt und Colowick (1973) stellten aber eine große Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung der beiden Hexokinasen fest. So weisen beide Isoenzyme die gleiche Anzahl an Cystein-, Tryptophan-, Methionin-, Arginin- und Thyrosinresten auf und unterscheiden sich bei den anderen Aminosäuren nur wenig. Im Peptidmapping mit Trypsin ergaben sich 27 identische neben 16-18 verschiedenen Fragmenten. Auch die C-terminale und die ersten 11 N-terminalen Aminosäuren sind bei Hexokinase PI und PII identisch. Das zeigt, daß die beiden Enzyme wahrscheinlich durch eine Genduplikation entstanden sind.

Beide Hexokinasen liegen als Dimere aus identischen Monomeren mit einem Molekulargewicht von je 50.000 vor. Glucose, hohe Ionenstärke und niedriger pH führen zur Dissoziation (Schachmann, 1960; Ramel et al., 1963). Auch die Monomere sind katalytisch

aktiv und binden Glucose sogar besser als das Dimer. Wahrscheinlich wird die Bindungsstelle der Glucose im Dimer abgeschirmt. Die Monomeren werden aber von äußerst geringen Mengen an Trypsin durch Abspaltung der N-terminalen 11 Aminosäuren in die saureren S-Formen (SI, SII) überführt. Diese zeigen die gleichen kinetischen Parameter wie die nativen Enzyme, liegen aber bevorzugt als Monomere vor. Daß die N-terminalen Aminosäuren in beiden Isoenzymen identisch sind, für die katalytische Funktion aber nicht notwendig sind, weist darauf hin, daß die Dimerisierung von großer physiologischer Bedeutung sein könnte.

Beide Hexokinasen weisen eine ungewöhnliche Kinetik auf (Kosow und Rose, 1970 und 1971; eine Übersicht gibt Colowick, 1973). Sie reagieren bevorzugt nach einem "ordered" Mechanismus, wobei zuerst die Glucose bindet und zuletzt das Glucose 6-Phosphat freigesetzt wird. Die Bindung läuft zu einem kleineren Teil aber auch "random" ab. Bei einem pH um 7,1 tritt beim Isoenzym PII, auch im Monomer, ein negativ kooperativer Effekt mit ATP auf, außerdem eine Aktivierung durch Citrat, Orthophosphat und 3-Phosphoglycerat. Diese Effekte sind also nicht auf Wechselwirkungen der Untereinheiten im Dimer zurückzuführen. Es muß sich um einen "slow transition" Effekt handeln; das Monomere kann in verschieden aktiven Zuständen vorliegen, die sich nur langsam ineinander umwandeln. Die Hexokinasen sind also hysteretische Enzyme (Ainslie et al., 1972).

Aus der Röntgenstrukturanalyse der Hexokinasen PI und PII ergab sich, daß die beiden Untereinheiten im Dimer gegeneinander um 156° verdreht und um 1,38 nm zueinander verschoben sind. Danach wäre die Wechselwirkung der Untereinheiten heterolog; die Bindungsstellen der beiden Untereinheiten könnten unterschiedlich sein. Außerdem zeigte sich in der Röntgenstrukturanalyse, daß durch die Dimerisierung außer den beiden katalytischen Bindungsstellen auf den einzelnen Untereinheiten eine dritte Nucleotidbindungsstelle zwischen den Monomeren entsteht, die eventuell der

allosterischen Regulation dient (Steitz et al., 1976; Steitz et al., 1977; Anderson et al. 1978a; 1978b; Shoham und Steitz, 1980; Bennett et al., 1980a; 1980b). Eine verfeinerte Röntgenstrukturanalyse der Hexokinase PII mit einer Auflösung von 0,21 nm erlaubte es, Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz zu ziehen (Anderson et al., 1978c).

Neben den Hexokinasen PI, PII; SI, SII wurden noch weitere Formen der Hexokinase gefunden. Ramel et al. (1971) beschrieb eine Umwandlung der Hexokinase PII durch hohe Ionenstärke und extreme pH-Werte von einer C-Form unter Abspaltung eines Flavoproteins in eine B-Form mit anderen Bindungseigenschaften an Ionenaustauschern. Diese Umwandlung konnte jedoch in unserem Labor nicht bestätigt werden (Kopetzki, 1982). Schulze und Colowick (1969) isolierten eine Hexokinase PIII, wobei sie annahmen, diese sei aus dem Isoenzym PI entstanden. Kopetzki (1982) isolierte eine Hexokinase mit gleichem Elutions-pH von DE52-Säulen. Die relative Aktivität dieses Enzyms mit Fructose und Glucose als Substrat entsprach der Hexokinase PII. Beim Peptidmapping ergaben die Isoenzyme PII und PIII praktisch das gleiche Bandenmuster, eindeutig unterscheidbar vom Isoenzym PI. In Mutanten mit defektem PI-Strukturgen trat die PIII-Form weiterhin auf, nicht dagegen in Mutanten mit defektem PII-Strukturgen. Damit ist klar, daß die Hexokinasen PII und PIII vom gleichen Gen codiert werden. Vermutlich treten beide Formen auch tatsächlich in der Zelle auf. Die physiologische Bedeutung dieses Phänomens ist noch unklar.

Von den Mutanten mit Ausfall der Glucose-Repression zeigte die hex1-Mutante eine um die Hälfte verminderte, die hex2-Mutante eine um das 2-3fach erhöhte Hexokinaseaktivität. In beiden Fällen war das Isoenzym PII betroffen. Die hex1-Mutation ließ sich im Strukturgen der Hexokinase PII lokalisieren und führte zur Bildung eines katalytisch inaktiven Proteins. Die Mutation ist also allel zu der von Lobo und Maitra (1977a) isolierten PII Strukturgenmutante hxk2 (Entian, 1980a; Entian und Mecke, 1982). Die

hex2-Mutation bewirkt eine erhöhte Hexokinase PII-Produktion. Offenbar ist ein Regulatorprotein defekt, das sonst die Hexokinase PII-Synthese teilweise reprimiert (Entian, 1981). Diese Synthesesteigerung durch die hex2-Mutation wurde durch die cat80-Mutation wieder aufgehoben.

Mutanten im HEX2-Gen sind sehr empfindlich gegen Maltose im Medium. Dies liegt an einer unkontrollierten Maltoseaufnahme, wodurch toxische Konzentrationen intrazellulärer Glucose entstehen (Entian, 1980b). Streicht man hex2-Mutanten auf Maltose enthaltenden Platten aus, so wachsen neben Revertanten im hex2-Gen auch Mutanten in den Genen CAT1, CAT3 und MUR1 (Entian und Zimmermann, 1982). Dabei können cat1- und cat3-Mutanten nicht mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, sondern benötigen zusätzlich Glucose im Medium. Während bei der mur1-Mutation nur das Maltoseaufnahmesystem betroffen ist, weisen cat1- und cat3-Mutanten einen Derepressionausfall von Isocitrat Lyase, Fructose 1,6-bisphosphatase und Maltase auf und erlauben kein Wachstum mit Ethanol als Kohlenstoffquelle, obwohl die Atmung nicht geschädigt ist. Haploide Hefen mit den Genkombinationen hex2 cat1 oder hex2 cat3 zeigen eine normale Glucose-Repression, bei den Kombinationen hex1 cat1 oder hex1 cat3 dagegen einen Repressionsausfall. Die Gene cat1 und cat3 sind also epistatisch über hex2, nicht aber über hex1. Der Derepressionsausfall durch cat1 und cat3 wurde durch die Mutation des Gens CAT2 aufgehoben (Zimmermann et al., 1977). Auch die von Ciriacy (1977) beschriebenen Genorte CCR2 und CCR3 sind an der Derepression beteiligt.

In Kreuzungsexperimenten zeigte sich, daß offensichtlich nicht die vorhandene Hexokinasemenge, etwa durch die Produktion von regulatorisch wirksamen Metaboliten, entscheidend für die Glucose-Repression ist, sondern das Vorhandensein des Isoenzyms PII. Auch ist die Konzentration der Glycolysemetabolite in hex1-Mutanten gegenüber dem Wildtyp nicht erkennbar verändert (Entian und Zimmermann, 1980). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, daß die

Hexokinase PII eine von der katalytischen Funktion unabhängige regulatorische Funktion besitzt. Um dies zu beweisen, wurden Strukturgenmutanten der Hexokinase PII selektioniert, die eine katalytisch aktive Hexokinase PII produzieren, deren Hexokinase die Glucose-Repression aber nicht mehr verursacht. Dazu wurde ein diploider Stamm konstruiert, der nur ein Gen für eine funktionsfähige Hexokinase PII und keins für eine funktionsfähige Hexokinase PI besaß. Auf Glucose angezogene Zellen dieses Stammes wurden auf Platten ausgestrichen, die wenig 2-Deoxy-D-Glucose neben viel Raffinose enthielten. Außerdem wurde die Zellatmung durch Antimycin A blockiert. Es konnten nur Zellen mit Ausfall der Glucose-Repression überleben. Energiegewinnung und damit Zellwachstum war aber nur möglich, wenn die Zelle die gebildete Fructose vergären konnte. Dazu ist eine intakte Hexokinase notwendig. Das Auftreten von rezessiven Mutationen in anderen Regulationsgenen der Glucose-Repression ließ sich ausschließen, da die entsprechenden Gene alle diploid vorlagen und Doppelmutanten extrem selten sind. Die isolierten Mutanten (*hex1*^{r}) zeigten einen Ausfall der Glucose-Repression, besaßen aber noch eine katalytisch aktive Hexokinase PII. Der Repressionsausfall betraf die Enzyme Maltase, Invertase, Malat Dehydrogenase und NADH Dehydrogenase; dagegen waren Malat Synthase und Fructose 1,6-bisphosphatase normal reprimiert (Entian und Fröhlich, 1984).

1. 4. Genetische und molekularbiologische Arbeitsmöglichkeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae bietet gegenüber den meisten anderen Organismen den Vorteil, daß sie sich haploid, diploid und höher polyploid stabil vermehren läßt. Bei den haploiden Hefen existieren zwei Paarungstypen, a und alpha, die zu diploiden Zellen paaren können. Durch Protoplastenfusion lassen sich auch Hefen gleichen Paarungstyps zu paarungstyphomozygoten Diploiden und Diploide zu Polyploiden verschmelzen. Diploide Zellen wiederum bilden auf Kaliumacetat-Medium vier haploide Ascosporen (Fowell,

1952), die sich im Mikromanipulator trennen lassen, so daß die vier Tochterzellen einer diploiden Ausgangszelle isoliert werden können. Dadurch lassen sich in Hefe sowohl rezessive als auch dominante Mutationen leicht ausprägen; verschiedene Mutationen können gezielt rekombiniert werden, und die Mutationen lassen sich leicht auf den Hefechromosomen kartieren (eine Übersicht geben Mortimer und Hawthorne, 1969; Abb. 2).

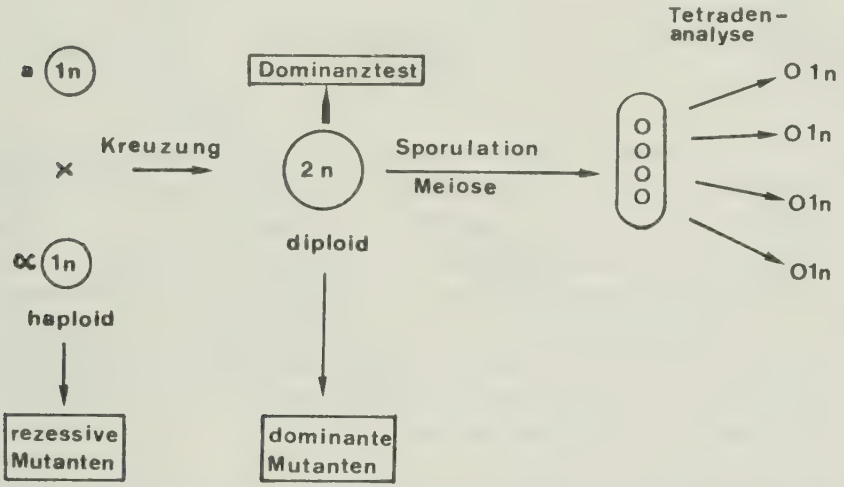


Abb. 2: Genetische Analysemöglichkeiten von Saccharomyces cerevisiae

Inzwischen ist es auch möglich, in die Hefe Saccharomyces cerevisiae gezielt DNA einzuschleusen, diese zu exprimieren und in das Genom zu integrieren. Zu diesem Zweck wurden hybride Plasmide konstruiert, die sich in Escherichia coli und Hefe replizieren. Nach dem Verhalten in Hefe unterscheidet man verschiedene Plasmidtypen. YIp-Plasmide können sich in Hefe nicht autonom replizieren und verbleiben daher nur nach Integration ins Genom in der Zelle; YRp-Plasmide enthalten ein Replikationsorigin (ARS) der Hefe und kommen in einer Stückzahl von ca. 30 pro Zelle vor; YEp-

Plasmide enthalten Teile des einzigen natürlichen Hefe-DNA-Plasmids, der 2 µm DNA, und liegen in ca. 40 Molekülen pro Zelle vor; YCp-Plasmide enthalten ein Hefecentromer und verhalten sich daher wie ein Hefechromosom (Struhl, 1983; eine Übersicht geben Botstein und Davis, 1982). Die Transformationsrate ist für die YIp-Plasmide in Hefe 10^5 mal geringer als für die übrigen Plasmide. Dafür ist das integrierte Plasmid, wie auch die YCp-Plasmide, deutlich stabiler als die YRp- und YEp-Plasmide, die ohne Selektionsdruck bei der Zellvermehrung verloren werden. Allerdings können auch YRp- und seltener YEp-Plasmide ins Hefegenom integrieren.

Um eine DNA-Sequenz in Hefe zu isolieren, fragmentiert man die Gesamt-DNA mit Restriktionsendonucleasen und ligiert sie in ein Plasmid, das als Vektor zur DNA-Übertragung dient. Aus dem so produzierten Genpool kann durch Transformation in Hefe und Selektion auf die gewünschte Eigenschaft ein Gen isoliert werden. Ist dies nicht möglich, können auch Escherichia coli-Zellen transformiert werden und die gesuchte Sequenz durch Hybridbildung mit der zuvor isolierten mRNA oder durch Reaktion des Genprodukts mit Antikörpern nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das von Struhl et al. (1979) und Stinchcomb et al. (1979) konstruierte Plasmid YRp7 als Vektor benutzt (Abb. 3). Es besteht aus dem vollständigen Escherichia coli-Plasmid pBR322, das neben einem bakteriellen Replikationsorigin Resistenzgene gegen Ampicillin und Tetracyclin enthält, und aus einem Hefe-DNA-Fragment. Dies Fragment besteht aus dem TRP1-Gen, das für die N-(5-Phosphoribosyl)-anthranilat Isomerase codiert, und einem Hefereplikationsorigin. Die vollständige Basensequenz von YRp7 ist bekannt (Sutcliffe, 1979; Tschumper und Carbon, 1980).

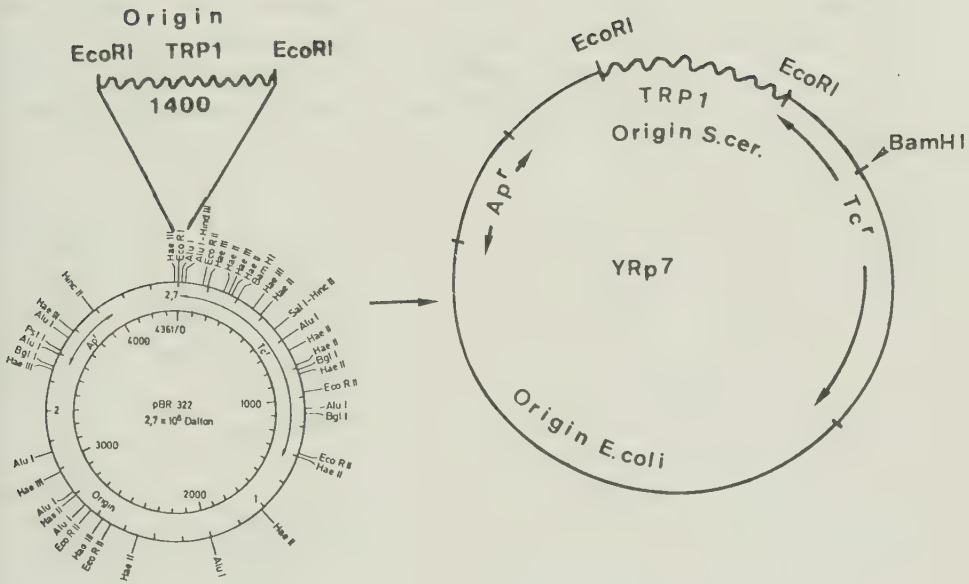


Abb. 3: Konstruktion und Restriktionskarte des Plasmids YRp7

1. 5. Aufgabenstellung

Das Hexokinaseisoenzym PII nimmt eine zentrale Funktion bei der Glucose-Repression der Hefe wahr. Die bisherigen Erkenntnisse stützen die Hypothese, daß es sich bei der Hexokinase PII um die Erkennungsstelle der Glucose-Repression ("recognition site") handelt, die in Gegenwart ihrer Substrate das Signal zur Auslösung der Glucose-Repression gibt. Zum Beweis einer regulatorischen Domäne auf dem PII-Molekül sollten in der vorliegenden Arbeit mit einem geeigneten Selektionssystem Hexokinase PII-Mutanten isoliert werden, deren regulatorische Funktion ohne Einfluß auf die

katalytische Aktivität spezifisch mutiert wurde. Die dadurch gewonnenen Mutanten wurden hexl^{r}-Mutanten genannt. Um einen Einblick in den molekularen Bereich der Repressionsauslösung zu gewinnen, sollte das Hexokinase PII-Gen kloniert und im Anschluß daran sequenziert werden. Der zukünftige Vergleich mit der Sequenz des Hexokinaseisoenzym PI-Gens und den hexl^{r}-Genen soll es ermöglichen, die regulatorische Domäne des Isoenzyms PII zu lokalisieren.

2. Material und Methoden

2. 1. Verwendete Stämme

Haploide Hefestämme (Saccharomyces cerevisiae)

catl.S3-14A	a			his4			MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	HXK1	HEX1	GLK1
hexl.19D-11A	a			his4		metl4				hxk1	HEX1	GLK1
hxk.O-3B	a	trpl	his2	his4			MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	hxk1	hex1	GLK1
hxk.O-7C	alpha	trpl	his2	his4			MAL2-8^{C}			hxk1	hex1	GLK1
hxk.O-9C	alpha	trpl		his4			MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3			
hxkO.Pl-2C	a	trpl	his2					MAL3	SUC3	HXK1	hex1	GLK1
hxkO.Pl-9D	alpha	trpl	his2					MAL3	SUC3	HXK1	hex1	GLK1
H.38-1B	a			his4			MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	HXK1	hex1	GLX1
H.38-4B	alpha			his4		leul	MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	HXK1	HEX1	GLK1
308.14A-11C	a	trpl	his2	his4						HXK1	HEX1	GLK1
Pl.1-2B	a	trpl				leul	MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	hxk1	HEX1	glk1
Pl.2-3A	alpha	trpl		his4			MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	HXK1	hex1	glk1
Pl.6-2C	a			his4			MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	HXK1	hex1	GLK1

Diploide Hefestämme (Saccharomyces cerevisiae)

19.6	a	TRP1	HIS2	his4	adel	metl4		MAL3	SUC3	hxk1	HEX1	GLK1
	alpha	trpl	his2	HIS4	adel	metl4	MAL2-8^{C}			hxk1	hex1	GLK1
hxk.O/PI	a	TRP1	his2	HIS4	adel			MAL3	SUC3	HXK1	hex1	GLK1
	alpha	trpl	HIS2	his4	ADE1		MAL2-8^{C}	MAL3	SUC3	hxk1	hex1	GLK1

Die verwendeten Hefestämme leiten sich von Stämmen des Department of Genetics der Universität von Washington, Seattle, USA und des Yeast Genetic Stock Center, Donner Laboratories, University of California, Berkeley, USA ab.

Gensymbole: Mit a und alpha sind die Paarungstypen bezeichnet. trp1, his2, his4, ade1, leu1 und met14 verursachen ein Bedürfnis der entsprechenden Aminosäure, bzw. von Adenin. MAL2-8^c erlaubt eine induktorunabhängige Maltasesynthese. Das Gen unterliegt aber weiterhin der Glucose-Repression (Zimmermann und Eaton, 1974). Die eng gekoppelten Gene MAL3 und SUC3 ermöglichen die Synthese von Maltase bzw. Invertase. hxk1, hxk2 und glk1 sind Strukturgenmutanten der Hexokinasen PI, PII und der Glucokinase (Lobo und Maitra, 1977b). hex1 ist allel zu hxk2 und verursacht einen Ausfall der Glucose-Repression (Entian, 1980a).

Zur Plasmidvermehrung wurde der Escherichia coli K12 Stamm RR1 (Genotyp pro$^-$ leu$^-$ thi$^-$ lacY$^-$ Str^r endoI$^-$) eingesetzt. pro$^-$, leu$^-$ und thi$^-$ verursachen ein Bedürfnis von Prolin, Leucin bzw. Thiamin. lacY$^-$ ist eine Mutation im Permease-Gen des lac-Operons. Str^r erzeugt eine Streptomycinresistenz. Die Mutation endoI$^-$ bewirkt einen Ausfall der Restriktionsendonuclease EcoRI.

2. 2. Kulturmedien

Hefemedien: Vollmedien bestanden aus 1% Hefeextrakt, 2% Bacto Pepton (YEP) und 4% Glucose oder Fructose bzw. 3% Ethanol als Kohlenstoffquelle. Zur Blockierung der Atmung wurde gegebenenfalls 1 mg Antimycin A pro Liter zugefügt. Minimalmedien (SM + Aminosäuren) enthielten 0,67% Yeast Nitrogen Base, die jeweils angegebenen Aminosäuren (Adenin 10 mg/l; Histidin, Methionin und Tryptophan 20 mg/l; Leucin 30 mg/l) und 2% Glucose oder Fructose. Zur Hefetransformation wurde SM + Histidin mit 2% Fructose und 1,2 M Sorbit verwendet. Das zur Isolierung der hex1^r-Mutanten verwandte Medium enthielt neben YEP 4% Fructose 200 mg 2-Deoxyglucose und 4 mg Antimycin A pro Liter. Sporulationsmedium enthielt 1% Kaliumacetat, Wasseragar nur 1,5% Agar in Wasser.

Bakterienmedien: LB-Medium bestand aus 1% Bacto Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% NaCl. Es wurde mit NaOH auf pH 7,5 einge-

stellt. In Antibiotikamedien wurden zusätzlich 40 mg Ampicillin bzw. 30 mg Tetracyclin pro Liter eingewogen.

Für feste Medien wurde 1,5% Agar zugegeben. Alle Medien wurden im Autoklaven 20 Minuten bei 121°C sterilisiert.

Für Dauerkulturen von Escherichia coli wurde zu 0,5 ml einer frischen Kultur 1 ml 67% Glycerin, 13,3 mM Magnesiumchlorid gegeben. Die Zellen bleiben bei -20°C mindesten zwei Jahre lebensfähig.

2. 3. Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Serva (Heidelberg) und Boehringer (Mannheim) bezogen. Hefeextrakt, Bacto Pepton, Bacto Trypton, Yeast Nitrogen Base und Agar stammten von Difco (USA). Restriktionsenzyme, T_4-Ligase, T_4-Kinase und DNA-PolymeraseI kamen von Boehringer (Mannheim) und Bethesda Research Laboratories (Neu Isenburg).

2. 4. Puffer

Für häufig verwendete Puffer wurden folgende Abkürzungen benutzt:

KPP-Puffer 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5

Sammelgelpuffer 48 mM Tris/Phosphorsäure pH 6,9 mit 0,46 ml TMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)/100 ml

SCE-Puffer 1 M Sorbit, 0,1 M Natriumcitrat, 0,06 M EDTA pH 7,0

SCE-Zymolyasemix SCE mit 4 µl Mercaptoethanol und 1 mg Zymolyase 5000 (Kirin Brewery, Japan) pro ml

SCP-Puffer 30 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA pH 6,2 mit HCl

SSC-Puffer 17 mM Trinatriumcitrat, 150 mM NaCl pH 7,0 mit HCl

STET-Puffer 8% Sucrose, 5% Triton-X 100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0

TE-Puffer 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0

TRAP-Puffer 50 mM Triethanolamin/HCl pH 7,5
Trenngelpuffer 0,3 M Tris/HCl pH 7,5 mit 0,23 ml TMED/100 ml
TS-Puffer 10% Sucrose in 50 mM Tris/HCl pH 8,0

2. 5. Genetische Methoden

Zur Mutagenisierung wurden die Hefezellen 2 h bei 30°C in KPP-Puffer mit 1% Ethylmethansulfonat inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und zur Mutationsausprägung 8 h in YEP 8% Fructose geschüttelt.

Zur Sporulation wurden stationäre Hefezellen aus 5 ml Flüssigkultur in dicker Suspension auf Sporulationsplatten gegeben (Fowell, 1952). Nach 3 Tagen bei 28°C ließen sich die gebildeten Asci im Mikroskop erkennen. Zur Tetradensegregation wurden die Asci in 0,5 ml sterilem Wasser suspendiert und mit 0,01 ml alpha-Glucuronidase/Arylsulfatase (Boehringer, Mannheim) 10 Minuten bei Raumtemperatur angedaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser gestoppt. Die Asci wurden durch Zentrifugation geerntet und bei 4°C gelagert. Zur Vereinzelung der Sporen wurden die angedauten Asci auf Wasseragar ausgestrichen und mit einem De Fonbrune Mikromanipulator zerlegt. Die Wasseragarplättchen wurden auf eine YEP 4% Glucose-Platte abgelegt. Nach 2 - 4 Tagen waren Kolonien zu sehen.

Zur Kreuzung wurden Hefen mit komplementierenden Auxotrophien eingesetzt. Zur Erzeugung von Triploiden mußten beide Kreuzungspartner mindestens zwei Auxotrophien aufweisen. Die Zygotenbildung wurde auf YEP 4% Glucose-Platten durchgeführt. Zur Isolierung der diploiden Zellen wurde auf Minimalmedium überstempelt.

2. 6. Zellanzucht und Rohextraktgewinnung

5 ml Flüssigmedium in 20 ml-Reagenzgläsern wurden mit einer Platinöse von Kulturplatten angeimpft und bei 28°C geschüttelt. Exponentiell wachsende Zellen wurden bei einem Titer von $5x10^7$ - $1x10^8$ Zellen/ml und ggf. vor Glucoseverbrauch durch Zentrifugation geerntet. Stationäre Zellen wurden 6 h nach Glucoseverbrauch geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit KPP-Puffer gewaschen und konnten ohne Verlust von Enzymaktivität eingefroren werden. Zur Isolierung von chromosomaler oder Plasmid-DNA wurden die Zellen ohne Zwischenlagerung aufgearbeitet.

Zur Rohextraktgewinnung wurden zu den Zellen 1 g Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) gegeben und 90 Sekunden auf einem Reagenzglasschüttler (Heidolph) geschüttelt (nach Ciriacy, 1975). Die Aufschlußrate betrug über 95%. Zu den Zelltrümmern wurden 1,5 ml KPP-Puffer gegeben und die Suspension 15 Minuten bei 6 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt verwendet.

2. 7. Protein- und Enzymbestimmungen

Der Proteingehalt wurde nach der Mikrobiuretmethode bestimmt (Zamenhoff, 1957). Zu 1 ml KPP wurden 0,1 ml Rohextrakt und 0,5 ml Mikrobiuretlösung (0,21% Kupfersulfat in 7,9 M NaOH) gegeben und nach 10 Minuten die Extinktion bei 290 nm mit Rinderserumalbumin als Standart gemessen.

Alle Enzymtests wurden bei 30°C durchgeführt. Gestartet wurde durch Substratzugabe. Alle Reaktionen, bei denen NADH oder NADPH gebildet oder verbraucht wurde, wurden bei 366 nm gemessen.

Maltase (E.C. 3.2.1.20): Bestimmt wurde die Gesamtaktivität an alpha-Glucosidasen durch Hydrolyse von p-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranosid (PNPG) (Halverson und Ellias, 1958). 0,1 ml Rohextrakt und 1 ml 1 mM PNPG in KPP-Puffer wurden bei 30°C bis zum

Auftreten einer Gelbfärbung, höchstens aber 10 Minuten, inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 ml 1 M Natriumcarbonatlösung gestoppt und die Extinktion bei 400 nm gemessen.

$$\text{Spez. Aktivität (U/mg Protein)} = \frac{\text{OD} \times 0{,}81}{\text{min} \times \text{Protein/ml}}$$

Invertase (E.C. 3.2.1.26): Die bei der Saccharosehydrolyse freigesetzte Glucose wurde mit ABTS-Reagens (75 mg 2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazolon)-6'-sulfonat (ABTS), 6 mg Meerrettichperoxidase (600 U) und 12 mg Schimmelpilzglucoseoxidase (240 U) in 150 ml KPP-Puffer) nachgewiesen. Da auch Maltase Saccharose hydrolysiert, wurde der Test bei pH 4,5 durchgeführt. Bei diesem pH ist das Enzym inaktiv. 0,25 ml 0,1 M Kaliumacetatpuffer pH 4,5 und 0,01 ml Rohextrakt wurden bei 30°C vorinkubiert. Gestartet wurde mit 0,15 ml 0,33 M Saccharose in 0,1 M Kaliumacetatpuffer pH 4,5. Nach 3 Minuten wurde die Reaktion durch Erhitzen in siedendem Wasser (30 sec) gestoppt und die Gläschen auf Eis gekühlt. Danach wurde 1 ml ABTS-Reagens zugegeben und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Extinktion wurde bei 430 nm gemessen.

$$\text{Spez. Aktivität} = \frac{\text{OD} \times 1{,}5}{\text{Protein/ml}}$$

Hexokinase (E.C. 2.7.1.2 und 2.7.1.4): Hexokinase mit D-Glucose als Substrat wurde nach Maitra und Lobo (1971) bestimmt. Das entstehende Glucose 6-Phosphat wird zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert. Das dabei gebildete NADPH wird bei 366 nm gemessen.

Testgemisch: 10 mM Glucose
0,6 mM ATP
0,4 mM $NADP^+$
0,5 U/ml Glucose 6-phosphat Dehydrogenase
0,1 ml Rohextrakt
50 mM TRAP-Puffer

Mit Fructose als Substrat wurde das gebildete Fructose 6-phosphat durch 0,5 U/ml Phosphoglucose Isomerase zu Glucose 6-phosphat isomerisiert.

Malat Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37): Die Messung wurde nach Wolfe und Neilands (1956) durchgeführt.

Testgemisch:	100	mM D,L-Natriummalat
	2,5	mM NAD^+
	0,1	ml Rohextrakt
	50	mM Tris/HCl pH 8,0

Fructose 1,6-bisphosphatase (E.C. 3.1.3.11): Das Enzym wurde nach Gancedo und Gancedo (1971) bestimmt. Das entstehende Fructose 6-phosphat wurde zu Glucose 6-phosphat isomerisiert und von der Glucose 6-phosphat Dehydrogenase unter Bildung von NADPH zu 6-Phosphogluconat oxidiert.

Testgemisch:	1	mM Fructose 1,6-bisphosphat
	0,5	mM $NADP^+$
	0,7	U/ml Phosphoglucose Isomerase
	0,7	U/ml Glucose 6-Phosphat Dehydrogenase
	0,1	ml Rohextrakt
	10	mM Magnesiumchlorid
	100	mM Kaliumchlorid
	50	mM Imidazol/HCl pH 7,0

Malat Synthase (E.C. 4.1.3.2): Die Enzymaktivität wurde nach Dixon und Kornberg (1959) bestimmt. Bei 232 nm wird der Verbrauch des Acetyl-CoA gemessen.

Testgemisch: 1 mM Natriumglyoxylat
25 µM Acetyl-CoA
2 mM Magnesiumchlorid
0,1 ml Rohextrakt
100 mM KPP-Puffer

NADH Dehydrogenase (NADH-Cytochrom C Oxidoreductase, E.C. 1.6.2.1) wurde nach Duncan und Mackler (1966) gemessen. Beobachtet wird die Extinktionsänderung des Cytochrom C bei 550 nm. Das Cyanid verhindert die Reoxidation des Cytochrom C.

Testgemisch: 0,2 mM NADH
50 µM Cytochrom C
1,7 mM Kaliumcyanid
0,5 mg/ml Rinderserumalbumin
0,1 ml Rohextrakt
100 mM KPP-Puffer

Zur Anfärbung von Enzymaktivität in Elektrophoresegelen wurde ein 1 cm breiter Streifen des Gels in 1 mm breite Stücke geschnitten und diese mit 0,5 ml der entsprechenden Testlösung bei 30°C inkubiert. Danach wurden 0,5 ml 0,1% MTT und 0,0175% Phenazinmethosulfat zugegeben und der entstandene blaue Farbstoff bei 578 nm gemessen (Fröhlich und Entian, 1982).

2. 8. Elektrophoretische Methoden

Diskontinuierliche Elektrophoresen zur Proteintrennung wurden nach dem System von Davis (1964) und Ornstein (1964) mit 10% Acrylamid im Trenn- und 3,75% Acrylamid im Sammelgel durchgeführt. 15 ml Trenngelpuffer, 12 g Acrylamid und 0,32 g N,N'-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid) wurden mit Wasser auf 120 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde entgast, 0,8 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat zugegeben und ein 2 mm dickes und 14 cm langes Trenngel gegossen. Die Polymerisationsdauer betrug 30 - 60 Minuten. An-

schließend wurden 10 ml Sammelgelpuffer, 3 g Acrylamid, 0,75 g Bisacrylamid und 10 ml Glycerin mit Wasser auf 80 ml ergänzt und entgast. Die Polymerisation wurde mit 0,28 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat gestartet und das Sammelgel mit 1 cm breiten Taschen gegossen. Der Abstand von Taschen zu Trenngel muß mindestens 4 cm betragen. Nach 30 Minuten Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Proben in 30% Glycerin und 0,001% Bromphenolblau aufgetragen. Die Proteinkonzentration betrug, falls nicht anders erwähnt, 1 mg/cm Gelbreite. Die Elektrophorese wurde mit 130 V gestartet und die Leistung am Spannungsgeber begrenzt. Während des Laufes stieg die Spannung auf etwa 180 V. Die Bromphenolblaubande eluierte nach ca. 12 h. Das Gel wurde zur Anfärbung auf Enzymaktivität verwendet oder nach Weber und Osborn (1969) mit Coomassie Blue zur Proteindetektion angefärbt.

Zur Trennung von Plasmidfragmenten in Agarosegelen wurden 0,7 g Agarose (Bethesda Research Laboratories, Neu Isenburg) in 100 ml TBE aufgekocht, auf 48°C gekühlt und ein 15 cm langes Gel gegossen. Nach einer Stunde wurden die Proben in 30% Glycerin und 0,04% Bromphenolblau aufgetragen. Die Elektrophorese lief mit 1 V pro cm und wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront noch 3 cm vom Gelende entfernt war. Das Gel wurde 1 h in 0,001%iger Ethidiumbromidlösung angefärbt (nach Sharp et al., 1973) und auf einem Transilluminator mit 302 nm Mischfilter (Ultraviolet Products, San Gabriel, USA) mit einem 10x Rotfilter photographiert. Die Expositionsdauer betrug bei Blende 1:4 30 Sekunden auf 20 DIN Polaroidnegativfilm Typ 665.

Zur Strangtrennung von DNA-Fragmenten bis 300 Basenpaaren Länge wurde ein 8%iges Acrylamidgel mit 0,24% Bisacrylamid verwendet, für 200 - 1000 Basenpaare ein Gel mit 5% Acrylamid und 0,1% Bisacrylamid. Der Puffer in Gel und Kammern war 0,55x TBE. Die Polymerisation wurde mit 2 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat und 0,1 ml TMED gestartet und Gele von 2 mm Dicke und 40 cm Länge gegossen. Nach einer Polymerisationsdauer von minimal 2 Stunden wurde ein

Gelvorlauf bei 300 V für 1 h durchgeführt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in 30% Dimethylsulfoxid, 1 mM EDTA und je 0,05% Bromphenolblau und Xylencyanol 2 Minuten auf 95°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Die Elektrophorese wurde bei 300 V durchgeführt und mit einem Ventilator gekühlt, um ein Denaturieren der DNA zu vermeiden. Die Laufdauer richtete sich nach der Größe der gewünschten Fragmente. Bromphenolblau läuft im 8%igen Gel wie ein DNA-Fragment von 40 und im 5%igen Gel wie ein DNA-Fragment von 60 Basen Länge. Xylencyanol entspricht im Laufverhalten DNA von 150 bzw. 200 Basen Länge. Die Banden wurden nach Autoradiographie lokalisiert, ausgeschnitten und eluiert.

Zur Maxam-Gilbert-Sequenzierung wurden ultradünne Gele nach Danner et al. (1980) verwandt. Die Gele enthielten insgesamt 20%, 8% bzw. 6% Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 1:20, außerdem 7 M Harnstoff und TBE als Laufpuffer. Zur Herstellung der 0,2 mm dicken und 40 cm langen Gele wurde die untere Glasplatte mit 0,015 ml Silan GF31 (Wacker Chemie, München) in 5 ml p.a. Ethanol und 0,15 ml Eisessig silanisiert und die obere Glasplatte mit 2% Dimethyldichlorsilan in Tetrachlorkohlenstoff silikonisiert. Dadurch polymerisierte das Gel fest an die untere Platte und ließ sich nach der Elektrophorese gut von der oberen Platte lösen. Beide Platten wurden mit p.a. Ethanol gewaschen und poliert. Auf der unteren Platte wurden die 0,2 mm dicken Abstandshalter aus Teflonfolie mit Klebestreifen befestigt. Zu 75 ml der filtrierten Gellösung wurden beim 20%igen und 8%igen Gel 700 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat und 43 µl TMED gegeben, beim 6%igen Gel 1050 bzw. 58 µl. Ein Teil der Lösung wurde auf die untere Platte gegossen und die obere so darüber hinweggeschoben, daß ein kontinuierlicher Flüssigkeitsfilm entstand. Dabei wurde die restliche Lösung nachgegossen, bis beide Platten deckend aufeinander lagen. Der Kamm wurde eingeschoben und die Platten mit Photoklammern aneinandergepresst. Nach einer Stunde Polymerisationsdauer wurde das Gel an die Elektrophoreseapparatur geklammert, der Kamm entfernt und die Taschen gründlich gespült. Die Sequenzierproben

wurden in 80% entionisiertem Formamid, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA und jeweils 0,1% Bromphenolblau und Xylencyanol eine Minute auf 95°C erhitzt, auf Eis abgeschreckt und mit einer zur Kapillare ausgezogenen Mikropipette aufgetragen. Die Elektrophorese lief mit 2300 V, wobei die Geltemperatur 50 - 60°C betrug. Eine gleichmäßige Wärmeverteilung wurde mit einem Ventilator erreicht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Marker die gewünschte Position erreicht hatten. Danach wurden die Glasplatten getrennt. 6 und 8%ige Gele wurden 15 Minuten in 10% Eisessig fixiert und bei 65°C getrocknet. 20%ige Gele wurden mit Haushaltsfolie bedeckt, um ein Auskristallisieren des Harnstoffes zu verhindern. Die Autoradiographien wurden bei -80°C mit einer Verstärkerfolie Cronex Lightning Plus (Dupont) auf Kodak X-Omat Röntgenfilm durchgeführt. Entwickelt wurde 5 Minuten mit Roentogen liquid (Tetenal, Hamburg), danach 1 Minute gewässert und anschließend 3 Minuten mit Ilford Hypam (Ilford, England) fixiert.

2. 9. Elution von DNA aus Elektrophoresegelen

Sollte ein Plasmidfragment aus einem Agarosegel eluiert werde, so wurde das Gel nicht mit Ethidiumbromid gefärbt, sondern die Bande durch Fluoreszenzlöschung lokalisiert (Maxam und Gilbert, 1980). Dazu wurde das Gel auf eine in Polyethylenfolie eingeschweißte Dünnschichtchromatographieplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt. Bei 254 nm ließen sich die DNA-Fragmente als dunkelblaue Banden auf hellem Grund erkennen und wurden ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in einen Dialyseschlauch gegeben, der mit 0.05 x TBE gefüllt wurde. Die DNA wurde 3 h bei 300 V in einer Elektrophoresekammer im Kühlraum eluiert. Um die DNA vom Schlauch zu lösen, wurde die Spannung zum Schluß 2 Minuten umgepolt. Die Lösung wurde mit Phenol und mit Chloroform eluiert und die DNA mit 100 mM NaCl und 2 Volumina Ethanol gefällt. Enthielt die DNA noch störende Polysaccharide aus dem Gel, wurde sie, wie bei der Elution aus Strangtrennungsgelen beschrieben, an DEAE-Sephacel gereinigt.

Zur Elution der DNA aus Acrylamidgelen, wie es nach Strangtrennungen erforderlich war, wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in kleine Stücke zerschnitten. Das entstandene Homogenat wurde mit 2 Volumina Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA pH 8,0) mindestens 10 Stunden bei 37°C geschüttelt, kurz zentrifugiert und der Überstand über DEAE-Sephacel gereinigt. Dazu wurde das Gelmaterial mit TE-Puffer/60 mM NaCl äquilibriert und in 1 ml Eppendorfspitzen zu einer Säule mit einem Volumen von etwa 0,2 ml gegossen. Eine solche Säule kann 20 µg DNA binden. Sie wurde nacheinander mit TE-Puffer/600 mM NaCl, TE-Puffer und TE-Puffer/100 mM NaCl gewaschen. Die DNA-Lösung wurde aufgetragen und der Durchlauf reappliziert. Die Säule wurde mit 1 ml TE-Puffer/300 mM NaCl gewaschen und die DNA mit 1 ml TE-Puffer/600 mM NaCl eluiert. Das Eluat wurde je einmal mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit 2 Volumina Ethanol gefällt.

2.10. Isolierung von Plasmiden und chromosomaler DNA

Zur schnellen Isolierung von Plasmiden aus Escherichia coli wurde die Methode von Holmes und Quigley (1981) modifiziert angewandt. 0,5 ml stationäre Kultur des plasmidhaltigen Bakteriums wurden abzentrifugiert und die Zellen in 0,2 ml STET-Puffer suspendiert. 0,02 ml 1%ige Lysozymlösung wurden zugegeben, der Ansatz 60 Sekunden in siedendes Wasser gestellt und auf Eis abgekühlt. Zelltrümmer wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren abgetrennt und die DNA aus dem Überstand mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert, in 0,2 ml TE-Puffer/300 mM NaCl suspendiert und mit 0,2 ml Isopropanol gefällt. Die DNA wurde erneut abzentrifugiert, mit 0,5 ml 80%igem Ethanol gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Derart gereinigte DNA konnte für Restriktionsschnitte verwendet werden. Die Ausbeute betrug etwa 2 µg neben einem mehrfachen Überschuß an RNA.

Sollte das Plasmid zur Hefetransformation eingesetzt werden, wurde der Lyseüberstand mit Phenol extrahiert und die DNA zweimal mit 2 Volumina Ethanol gefällt. Mit einem solchen Ansatz wurden 20 - 100 Hefetransformanten erhalten.

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid, das zusätzlich RNA-frei war, wurde das Verfahren von Clewell und Helinski (1969) angewandt. Zu je einem Liter LB-Medium wurden 20 mg Ampicillin und 5 ml der entsprechenden Vorkultur von Escherichia coli gegeben. Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von 0,6 bei 550 nm wurden 80 mg Chloramphenikol zugegeben und weitere 10 bis 15 Stunden bei 37°C geschüttelt. Dadurch wird die Plasmidausbeute erhöht. Die Zellen wurden geerntet, mit TS-Puffer gewaschen und in 10 ml kaltem TS-Puffer suspendiert. Mit 0,5 ml 2%iger Lysozymlösung wurde 10 Minuten auf Eis die Zellwand verdaut, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 zugegeben und die Zellen mit 15 ml TLB unter Schütteln lysiert. Zur Vervollständigung der Lyse wurde 10 Minuten auf 65°C erwärmt. Die gallertigen Zelltrümmer mit dem Großteil der chromosomalen DNA wurden durch einstündige Zentrifugation bei 18 000 upm im Sorvall SS34-Rotor abgetrennt, der Überstand zweimal mit einer 1:1-Mischung von Phenol und Chloroform extrahiert und mit 300 mM NaCl und 2,5 Volumina Ethanol gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert, im Exsiccator getrocknet, in 8 ml TE gelöst und durch isopyknische Zentrifugation im Cäsiumchlorid-Gradienten weiter gereinigt.

Dazu wurden zu 8 ml DNA-Lösung 0,6 ml Tris/HCl-Puffer pH 7,5 und 0,08 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 zugegeben und das Nettogewicht der Lösung bestimmt. Es wurde die nach der Formel (Nettogewicht + 1 g) x 0,978 berechnete Menge Cäsiumchlorid darin gelöst, 1 ml 1%iges Ethidiumbromid zugegeben, die Gläschen mit Paraffinöl auf höchstens 10 mg Unterschied tariert und 40 - 48 Stunden bei 40000 upm im Ti60-Rotor zentrifugiert. Die RNA pelletierte bei der Zentrifugation. Die Plasmide waren in der unteren Bande lokalisiert. Die gewünschte Bande wurde abgepumpt, 5 x mit Butanol

extrahiert und mit 3,5 Volumina 70%igem Ethanol gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert, getrocknet, in 1 ml TE-Puffer gelöst und unter mehrfachem Pufferwechsel gegen TE-Puffer dialysiert. Der DNA-Gehalt wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine 0,1%ige DNA-Lösung hat theoretisch eine Extinktion von 20 bei 260 nm. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Verunreinigungen wie RNA oder Phenolreste vermindern diesen Quotienten.

Zur Isolierung von Hefe-DNA zum Southern-Hybridisieren oder für einen Hefe-Genpool wurde die Hefe aus 1 l stationärer YEP 4% Glucose-Kultur geerntet, gewaschen und in 2 ml SCE-Zymolyasemix pro Gramm Hefe 2 h bei 37°C verdaut. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3,5 ml 3% Sarkosyl NL-97 (Serva, Heidelberg) in 0,5 M Tris/HCl, 0,2 M EDTA pH 9 pro Gramm Hefen lysiert. Die Suspension wurde 15 Minuten auf 65°C erhitzt und die chromosomale DNA durch Einstellen der Lösung auf 1 M NaCl ausgefällt und abzentrifugiert. Die DNA wurde in TE-Puffer gelöst, je einmal mit Phenol und mit Chloroform extrahiert und mit 200 mM NaCl und einem Volumen Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, getrocknet, in 8 ml TE gelöst und zur Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation eingesetzt.

Zur Isolierung von Plasmiden aus Hefe nach Nasmyth und Reed (1980) wurden 5 ml stationäre Hefezellen geerntet und in 0,1 ml SCE-Zymolyasemix 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen lysierten durch Zugabe von 0,1 ml 2% SDS, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA pH 8,0. Mit 0,05 ml 5 M NaCl wurde die chromosomale DNA gefällt und abzentrifugiert. Die Plasmide wurden aus dem Überstand mit 0,5 ml Ethanol gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und durch erneutes Lösen und Fällen weiter gereinigt. Die Plasmidausbeute ergab in der Transformation in Escherichia coli einige hundert Kolonien.

2.11. Restriktionsverdaus und Ligation von DNA

Für die Restriktionsverdaus wurden die von den Lieferfirmen angegebenen Testbedingungen verwendet. Für vollständige Verdaus wurde pro µg Plasmid 4 h mit 0,5 U Restriktionsenzym verdaut, für partielle Schnitte 1 h mit 0,1 - 0,5 U Enzym. Bei partiellem Verdau wurde die Reaktion durch Phenolextraktion gestoppt und die DNA mit Ethanol gefällt. Verwendet wurden die Restriktionsenzyme AccI, AvaI, AvaII, BamHI, BclI, BglI, BglII, BstEII, DdeI, EcoRI, HincII, HindIII, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, PstI, SacI, SalI, Sau3A, SmaI, SphI, SstI, TaqI und XorII.

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden diese in 66 mM Tris/HCl pH 7,6, 6,6 mM Magnesiumchlorid, 10 mM DTT, 66 µM ATP und 2,5 U T_4-DNA-Ligase 12 - 16 h bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde direkt zur Transformation in Escherichia coli genommen.

2.12. Phosphatabspaltung und Markierung von 5'-Enden der DNA

Um bei der Genpoolherstellung die Selbstligation zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatreste des aufgeschnittenen Vektors mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) entfernt. Pro pmol 5'-Enden, das entspricht 2 µg eines 4 kBp-Fragments, wurden 10 U BAP in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 eingesetzt und eine Stunde bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde mit Phenol und mit Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt.

Wenn das 5'-Ende markiert werden sollte, wurde der Phosphatrest mit einer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; calf intestinal phosphatase) hydrolysiert (Chaconas und van de Sande, 1980). Es reichen 0,01 U CIP zur vollständigen Spaltung von 1 nmol 5'-Phosphatresten. Bei 5'-überstehenden Enden lief die Reaktion in 50 mM Tris/HCl pH 9,0, 1 mM Magnesiumchlorid, 0,1 mM Zinkchlorid und 1 mM Spermidin eine Stunde bei 37°C. Bei überstehenden 3'-Enden, wie sie das Restriktionsenzym PstI erzeugt, wurde im gleichen

Puffer 30 Minuten bei 37°C und 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Da die CIP zinkabhängig und hitzelabil ist, läßt sie sich anschließend durch Erhitzen auf 68°C für 15 Minuten in Gegenwart des Chelatbildners Trinitriloessigsäure vollständig inaktivieren.

Zur Markierung der 5'-Enden mit ^{32}P-Phosphat wurden 1 - 5 nmol DNA mit freien Hydroxylgruppen am 5'-Ende mit 5 U T_4-Polynucleotid Kinase und 100 µCi gamma^{32}P-ATP umgesetzt. Fragmente mit überstehenden 5'-Enden reagierten 30 Minuten bei 37°C in 50 mM Tris/HCl, 10 mM Magnesiumchlorid, 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA. Fragmente mit überstehenden 3'-Enden oder gleichlangen ("blunt") Enden wurden vor der Markierung in 20 mM Tris/HCl pH 9,5, 1 mM Spermidin, 0,1 mM EDTA eine Minute bei 70°C denaturiert, ein Zehntel des Volumens an 500 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM Magnesiumchlorid, 50 mM DTT und 50% Glycerin zugegeben und die Reaktion mit markiertem ATP und Kinase gestartet.

Zum Abtrennen von nicht eingebautem ATP wurden verschiedene Methoden angewandt:

(i) Das ATP wurde durch Gelfiltration von der markierten DNA getrennt. Dazu wurde das Kinasegemisch über eine Sephadex G75-Säule von 7 ml Volumen fraktioniert. Um unspezifische Bindung zu vermeiden, war das Säulenmaterial mit 1 µg tRNA/ml TE vorbehandelt worden. Die markierte DNA eluierte bei 2,5 - 3,5 ml, das ATP bei 4,5 - 7 ml.

(ii) Schneller war die Trennung mittels Zentrifugation durch eine kleine Sephadex G50-Säule. Dazu wurde 1 ml Gelsuspension in einer Eppendorfspitze mehrfach bei 1600g zentrifugiert und dabei jeweils mit 100 µl TE gewaschen. Die DNA-Lösung wurde in einem Volumen von 100 µl aufgetragen und bei der gleichen Drehzahl exakt die gleiche Zeit wie bei den Waschungen zentrifugiert. Die DNA wurde dabei eluiert und aufgefangen; das ATP blieb in der Säule.

(iii) Am einfachsten und mit der geringsten Strahlenbelastung verbunden war die Trennung durch mehrfaches Fällen. Die Lösung wurde auf 2 M Ammoniumacetat gebracht und mit 2 Volumina Ethanol gefällt. Der Zentrifugationsüberstand wurde zum radioaktiven Abfall gegeben, die DNA in 2 M Ammoniumacetat gelöst und mit Ethanol gefällt. Diese Fällung wurde noch einmal wiederholt. Das ATP konnte auf diese Weise vollständig entfernt werden.

2.13. Synthese von gamma^{32}P-ATP

Zur Synthese von gamma-markiertem ATP aus ^{32}P-Phosphat und ATP wurde die Phosphataustauschreaktion von Glynn und Chappell (1964) angewandt. Dabei stellt sich durch die Enzyme Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase und 3-Phosphoglycerat Kinase ein Gleichgewicht zwischen freiem und in Gamma-Stellung in ATP eingebautem Phosphat her. Die eingesetzten Enzyme mußten vorher von Ammoniumionen freigewaschen werden. Dazu wurden sie in einer Schlaufe aus Hohlfasern gegen den Reaktionspuffer zentrifugiert. Eingesetzt wurden 5 U Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase und 10 U 3-Phosphoglycerat Kinase in 500 µl aus 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM Magnesiumchlorid, 2 mM Glutathion, 1 mM 3-Phosphoglycerat, 0,1 mM EDTA, 0,01 mM NAD^+, 0,04 mM ATP und 5 mCi ^{32}P-Phosphat. Nach 30 Minuten bei 30°C wurde die Reaktion mit 4 µl 500 mM EDTA beendet und die Enzyme durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Zur Stabilisierung wurden 1,4 ml Ethanol zugegeben und die Lösung bei -20°C gelagert.

Zur Überprüfung der Synthesereaktion wurde 1 µl auf eine Polyethylenimin-Dünnschichtchromatographieplatte getüpfelt und eine Trennung mit 0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 3,5 durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden autoradiographisch lokalisiert. Phosphat hatte einen Rf-Wert von 0,65, ATP einen von 0,25.

2.14. Plasmidtransformation in Escherichia coli

Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien müssen die Zellen von Escherichia coli erst durch eine Behandlung mit Calciumchlorid in der Kälte in einen Zustand gebracht werden, in dem sie DNA aufnehmen können (Cohen et al., 1972). Ein Hitzeschock erhöht die Aufnahmerate. Escherichia coli RR1 wurde auf 100 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD von 0,6 bei 600 nm angezogen, abzentrifugiert und in einem Eis/Wasserbad in 40 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM Calciumchlorid suspendiert. Die Zellen schwollen bei dieser Prozedur an. Sie wurden in der Kälte abzentrifugiert, in 4 ml Tris/Calciumchloridlösung aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C stehengelassen. 0,1 ml der kompetenten Bakteriensuspension wurden zu der entsprechenden DNA gegeben und 30 Minuten im Eis/Wasserbad inkubiert. Die Suspension wurde 2 Minuten auf 42°C erwärmt, auf Eis gekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Zur Expression der Resistenz wurde der Ansatz 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und auf LB/Ampicillin-Platten ausplattiert. Nach 16 h bei 37°C waren die Transformanten als Kolonien zu sehen.

2.15. Plasmidtransformation in Saccharomyces cerevisiae

Hefezellen sind von einer Zellhülle umgeben, die das Eindringen größerer Moleküle verhindert. Diese Hülle wird zur Erzeugung kompetenter Zellen abgedaut. Die entstehenden Sphaeroplasten sind osmotisch labil; daher wird in hypertonem Medium mit 1,2 M Sorbit gearbeitet. Die Transformation wurde nach Beggs (1978) durchgeführt. Exponentiell auf 100 ml YEP 4% Glucose wachsende Hefezellen wurden bei einem Titer von 2 - 10 x 10^7/ml geerntet, mit Wasser gewaschen und in 10 ml 1,2 M Sorbit, 25 mM EDTA pH 8 mit 75 mg DTT 15 Minuten bei 30°C reduziert, um Disulfidbrücken zu spalten, die die Zellwand stabilisierten. Die Zellen wurden mit 10 ml 1,2 M Sorbit gewaschen und in 10 ml 1,2 M Sorbit, 100 mM Natriumcitrat, 10 mM EDTA pH 5,8 mit 0,1 ml alpha-Glucuronidase/

Arylsulfatase aus Helix pomatia (Boehringer, Mannheim) 1 h bei 30°C verdaut. Der Verdau wurde im Mikroskop kontrolliert. Sphaeroplasten waren schwach als dunkle kreisrunde Schatten neben den hellen ovalen intakten Zellen zu sehen. Die Sphaeroplasten wurden viermal mit 10 ml 1,2 M Sorbitlösung gewaschen, dabei wurde nur mit 1800g zentrifugiert und das Pellet vorsichtig durch wiederholtes Aufsaugen mit einer Glaspipette suspendiert. Zur Transformation wurden die Zellen in 0,8 ml 1,2 M Sorbit, 10 mM Calciumchlorid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5 suspendiert und pro Ansatz 0,1 ml zur Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 20°C inkubiert, 1 ml 20% Polyethylenglycol 4000 in 10 mM Calciumchlorid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5 zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert.

Die transformierten Zellen wurden abzentrifugiert und zur Ausprägung der plasmidcodierten Gene 30 Minuten in 1,2 M Sorbit, 5 mM Calciumchlorid, 0,5x YEP, 1% Glucose bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Selektion auf Hexokinase wurden die Zellen in 7 ml auf 46°C temperiertem 3%igen Agar mit 1,2 M Sorbit, SM + Histidin und 2% Fructose auf Platten aufgegossen, die das gleiche Medium, aber 2% Agar enthielten. Nach 24 h wurden weitere 7 ml Agar aufgegossen, die 0,1 mg Antimycin A enthielten. Kolonien waren nach ca. 3 Tagen zu sehen und wurden mit einem Platindraht aus der Agarschicht zum Abimpfen herausgeholt.

Zum Test auf Plasmidverlust wurden die Hefetransformanten auf YEP-Medium mit 4% Glucose geimpft, bis zur stationären Phase geschüttelt und mit einem Titer von 100 Kolonien/Platte auf YEP-Platten mit 4% Glucose ausgestrichen. Die Kolonien wurden auf Selektivplatten mit SM + Histidin, 4% Fructose und 1 mg/l Antimycin A überstempelt. Auf diesem Medium konnten nur plasmidhaltige Hefen wachsen.

2.16. DNA-Transfer und DNA-Hybridisierung nach Southern (1975)

DNA läßt sich durch Durchsaugen von Puffern aus Gelen eluieren und auf Nitrocellulosefilter übertragen (Southern-Transfer). Dazu wurde das Gel nach der Ethidiumbromid-Anfärbung zweimal 8 Minuten mit 0,25 M Salzsäure, zweimal 15 Minuten mit 1 M NaCl in 0,5 M Natronlauge und einmal 60 Minuten in 0,6 M NaCl in 1 M Tris/HCl pH 7,0 gewaschen. Dadurch wurde die DNA denaturiert, und die Stränge trennten sich. Unter das Gel wurde ein Stapel aus drei Vileda-Schwämmen und zwei Lagen Whatman 3MM-Papier gelegt und darüber ein Nitrocellulosefilter, eine Lage 3MM-Papier und ein Stoß Papierhandtücher. Die Vileda-Schwämme wurden in 0,5 l 4x SSC-Puffer gelegt. Durch die Kapillarwirkung der Papierhandtücher wurde die Lösung durch den ganzen Stapel gesaugt und die DNA auf das Nitrozellulosefilter übertragen. Nach 12 h wurde das Nitrocellulosefilter bei 65°C getrocknet, wodurch die DNA fest an die Nitrocellulose bindet.

Bei der Southern-Hybridisierung bindet einsträngige DNA aus der Lösung durch Basenpaarung an die einsträngige DNA auf dem Filter. Temperatur und Puffer bestimmen die Selektivität dieser Bindung und damit den Homologiegrad der Sequenzen. Unter den beschriebenen Bedingungen ist die Selektivität der Hybridisierung hoch, da nur sehr ähnliche Sequenzen hybridisieren. Um die Hybridisierung nachweisen zu können, mußte die DNA in der Lösung radioaktiv markiert sein. Das wurde durch eine "nick translation" erreicht (Rigby et al., 1977). 1 µg der zu markierenden DNA wurde in 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM Magnesiumchlorid, 50 µg Rinderserumalbumin/ml, je 10 µM dCTP, dGTP und dTTP und 10 Ci alpha-thio ^{35}S-dATP gelöst und die Translation mit 5 U Polymerase I aus Escherichia coli gestartet. Nach 2 - 3 h bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf eine Sephadex G100-Säule von 2 ml in 0,1% Sarkosyl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA aufgetragen und Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Die markierte DNA wurde in der zweiten Fraktion eluiert, nicht umgesetztes thio-dATP in der vierten Fraktion.

Zur Hybridisierung wurde das Filter mit 6 ml Prähybridisierungmix aus 1% Sarkosyl, 4x SCP mit 1 mg Herings-DNA/ml 2 Minuten inkubiert. Die markierte DNA wurde in der gleichen Lösung im siedenden Wasserbad denaturiert und mit dem Filter 12 - 20 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde das Filter bei 45°C zweimal mit 1% SDS in 2x SCP und zweimal mit 2x SCP je 15 Minuten und einmal mit 0,4x SCP 60 Minuten gewaschen. Das Filter wurde an der Luft getrocknet und zur Autoradiographie benutzt.

2.17. Basenspezifische Spaltungen nach Maxam und Gilbert (1977, 1980)

Maxam und Gilbert (1977) modifizierten chemische Reaktionen, die für bestimmte DNA-Basen spezifisch sind, so, daß nur ein definierter Anteil dieser Basen reagiert. Die anschließende ß-Eliminierung durch Erhitzen mit Piperidin führt zum Strangbruch. Das markierte Fragment wurde in 45 µl Wasser gelöst. Für Reaktionen, die für eine Base spezifisch ist, wurden 5 µl eingesetzt, bei zwei Basen 10 µl.

G Guaninspezifische Reaktion (Kochetkov und Budovskii, 1972): Guanin wird in 7-Stellung von Dimethylsulfat methyliert. 5 µl der Fragmentlösung wurden in 200 µl 50 mM Natriumcacodylat pH 8,0, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EDTA und 1 µl Dimethylsulfat 5 Minuten bei 20°C inkubiert, 50 µl kaltes 1,5 M Natriumacetat pH 7,0 mit 1 mM Mercaptoethanol und 0,1 mg/ml tRNA zugegeben und mit 750 µl Ethanol gefällt.

G+A Purinspezifische Reaktion (Lawley, 1966): Durch Säurebehandlung werden die Purine Guanin und Adenin abgespalten. 10 µl der Fragmentlösung wurden mit 10 µl Wasser und 2 µl 1 M Piperidiniumformiat pH 2,0 15 Minuten auf 37°C erwärmt, eingefroren und lyophilisiert. Anschließend wurden 20 µl Wasser zugegeben und erneut lyophilisiert.

C+T Pyrimidinspezifische Reaktion (Singer, 1975) und
C Cytidinspezifische Reaktion (Lawley und Brookes, 1963): Hydrazin spaltet den Pyrimidinring. In 1 M NaCl reagiert nur Cytidin. 10 µl Fragmentlösung und 10 µl Wasser bzw. 5 µl Fragmentlösung, 5 µl Wasser und 10 µl 5 M NaCl wurden 5 Minuten bei 20°C mit 30 µl Hydrazin inkubiert, 200 µl kaltes 300 mM Natriumacetat, 100 mM EDTA und 25 µg tRNA/ml zugegeben und die DNA mit 750 µl Ethanol gefällt.

A+C Durch Erhitzen in 1,2 N NaOH wird das Ringsystem von Adenin und schwächer der Ring von Cytidin gespalten (Lawley und Thatcher, 1963): 10 µl Fragmentlösung werden mit 100 µl 1,2 N NaOH, 1 mM EDTA 11 Minuten auf 95°C erhitzt, mit 150 µl 1 N Essigsäure neutralisiert und mit 5 µl tRNA (1 mg/ml) und 750 µl Ethanol gefällt. Die DNA wird abzentrifugiert, zweimal mit 80% Ethanol gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

T Thymidinspezifische Reaktion (Friedmann und Brown, 1978): Osmiumtetroxyd oxidiert in Gegenwart schwacher Basen Thymidin spezifisch zu 5,6-Dihydroxythymidin. 5 µl Fragmentlösung wurden mit 10 µl 5% Osmiumtetroxyd in Wasser und 1 µl Piperidin 11 Minuten bei 20°C inkubiert. Die Fällung erfolgte mit dem gleichen Puffer wie bei der C+T und der T Reaktion.

Die gefällte DNA aus den Reaktionen G, C+T, C und T wurde abzentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen, in 250 µl 300 mM Natriumacetat suspendiert und mit 750 µl Ethanol gefällt. Die DNA wurde erneut abzentrifugiert, zweimal mit 80% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Zur Strangbruchreaktion wurde 100 µl 1 M Piperidin in Wasser zugegeben und 60 Minuten auf 95°C erwärmt. Die Lösung wurde lyophilisiert und noch zweimal in je 20 µl Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Zum Auftrag auf die Sequenziergele wurde die DNA in 4 µl entionisiertem 80% Formamid mit 10 mM NaOH, 1 mM EDTA und je 0,1% Bromphenolblau und Xylencyanol gelöst, durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und je 1 µl pro Tasche aufgetragen.

3. Ergebnisse

3. 1. Isolierung und Charakterisierung der hex1^{r}-Mutanten

Die Untersuchung von Mutanten der Glucose-Repression gab Hinweise darauf, daß die Hexokinase PII zusätzlich zu ihrer katalytischen eine regulatorische Funktion ausübt. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollten Mutanten isoliert werden, deren Hexokinase PII zwar katalytisch aktiv war, aber nicht mehr die Glucose-Repression auslösen konnte. Dazu wurde das Selektionssystem von Zimmermann und Scheel (1977) modifiziert. Die Selektion geht dabei von der Beobachtung aus, daß exogene Glucose oder Fructose das Zellgift 2-Deoxyglucose kompetitiv vom Aufnahmesystem verdrängt und so die Giftwirkung aufhebt. Das Selektionsmedium enthält neben 2-Deoxyglucose einen Überschuß an Raffinose. Diese wird von der Hefe durch das Exoenzym Invertase, das der Glucose-Repression unterliegt, zu Fructose hydrolysiert. Auf Glucose gezogene Wildtyphefen besitzen keine Invertase. Plattiert man sie auf das Selektionsmedium, so nehmen sie 2-Deoxyglucose auf und sterben. Mutanten mit ausgefallener Glucose-Repression dagegen hydrolysieren die Raffinose und umgeben sich so mit schützender Fructose.

Zur Selektion von Mutanten mit defekter Regulationsstelle, aber katalytisch aktiver Hexokinase PII wurde der Stamm D19.6 eingesetzt. Er besitzt nur ein Gen, das für eine funktionsfähige Hexokinase PII codiert; die Hexokinase PI-Gene sind homozygot defekt. Zur Selektion wurde das Selektionssystem mit 2-Deoxyglucose und Raffinose verwandt und zusätzlich die Atmung mit Antimycin A vergiftet. Überlebende Zellen konnten daher nur wachsen, wenn sie Fructose vergären konnten. Eine Vermehrung war Glucose-Repressionsmutanten deshalb nur möglich, wenn die Hexokinase PII katalytisch aktiv vorlag. Da die übrigen Regulatorgene der Glucose-Repression in dem konstruierten Ausgangsstamm homozygot funktionsfähig vorlagen und eine Doppelmutation auszuschließen war, konnte ein Ausfall der Glucose-Repression nur durch eine Veränderung der Hexokinase PII verursacht werden. hex2 und cat80-Mutanten waren also nicht zu erwarten.

Um die Mutantenausbeute zu erhöhen, wurden die Zellen mit 1% Ethylmethansulfonat (EMS) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 zwei Stunden bei 30°C mutagenisiert. Die Überlebensrate betrug bei dem diploiden Stamm D19.6 etwa 99%; bei haploiden Hefen überlebten unter diesen Bedingungen etwa 50%. Zur Mutationsausprägung wurden die Zellen 8 h in YEP 8% Fructose inkubiert, anschließend mit Phosphatpuffer gewaschen und auf die Selektionsplatten mit einem Titer von 10^6/Platte ausgestrichen. Kolonien waren nach 3 - 8 Tagen zu sehen und wurden auf YEP 2% Glucose-Platten überimpft.

Aus insgesamt 3000 getesteten Kolonien konnten durch diese Selektion 35 unabhängig erzeugte Mutanten isoliert werden. In allen Mutanten war die Repression der Enzyme Maltase, Invertase, Malat Dehydrogenase und des Atmungsenzyms NADH Dehydrogenase ausgefallen. Dagegen waren Malat Synthase und Fructose 1,6-bisphosphatase normal reprimiert. Das Repressionsverhalten entsprach also dem der hex1-Mutanten. Im Gegensatz zu diesen besaßen die neu isolierten $hex1^r$-Mutanten jedoch alle eine katalytisch aktive Hexokinase mit einem Verhältnis von Fructose- zu Glucosephosphorylierung von 1,0 - 1,35, was für das Isoenzym PII charakteristisch ist (Tab. 1).

Die isolierten Mutanten unterschieden sich aber auch untereinander. Die spezifische Aktivität der Hexokinase im Rohextrakt lag zwischen 98 U/mg Protein für D19.6#936 und 272 U/mg für D19.6 #1663. Der Ausgangsstamm D19.6 besaß 261 U Hexokinase/mg. Die Mutanten mit niedriger Aktivität weisen darauf hin, daß die Mutation tatsächlich im Strukturgen der Hexokinase liegt und das aktive Zentrum durch die Mutation beeinflußt wird. An den Mutanten mit hoher spezifischer Aktivität dagegen sieht man, daß sich die regulatorische Funktion auch ohne Beeinflussung der katalytischen zerstören läßt. Die Hexokinase PII besitzt also tatsächlich eine von der katalytischen Domäne getrennt mutierbare regulatorische Region.

Spezifische Aktivitäten (U/mg Protein)

Stamm	Hexokinase Genotyp	Maltase	Invertase	MDH	Hexokinase Glucose	Hexokinase Fructose	Q F/G
D19.6	hxk1 HEX1 / hxk1 hex1	2	25	121	261	402	1,54
D19.6# 880	hxk1 hex1 / hxk1 hex1	239	700	432	68	b.d.	-
D19.6#1663	hxk1 hex1^{r} / hxk1 hex1	72	542	195	272	422	1,55
D19.6#1568	hxk1 hex1^{r} / hxk1 hex1	468	698	166	241	362	1,50
D19.6#1709	hxk1 hex1^{r} / hxk1 hex1	66	1009	370	189	280	1,48
D19.6# 877	hxk1 hex1^{r} / hxk1 hex1	22	540	378	142	173	1,22
D19.6# 777	hxk1 hex1^{r} / hxk1 hex1	25	329	369	130	155	1,19
D19.6#1804	hxk1 hex1^{r} / hxk1 hex1	262	649	480	115	120	1,04
D19.6# 936	hxk1 hex1^{r} / hxk1 hex1	128	494	496	98	100	1,02

Tab. 1: Repressionsverhalten und Hexokinaseaktivitäten nach Anzucht in YEP 2% Glucosemedium (MDH: Malat Dehydrogenase).

Auch der Repressionsausfall war in den verschiedenen Mutanten unterschiedlich ausgeprägt. So wies die Mutante D19.6#777 eine nur um den Faktor 10 erhöhte Maltaseaktivität gegenüber dem Ausgangsstamm auf, während bei D19.6#1568 die Maltase um mehr als das hundertfache gesteigert war. Dagegen war die Malat Dehydrogenase in D19.6#1568 nur wenig gegenüber dem Ausgangsstamm erhöht, während die Mutanten D19.6#777 und D19.6#936 eine signifikante Erhöhung zeigten. Die Invertaseaktivität war in allen Mutanten vergleichbar und etwa 30mal höher als im Ausgangsstamm. Das könnte bedeuten, daß die verschiedenen Enzyme unterschiedlich empfindlich auf das regulatorische Signal reagieren.

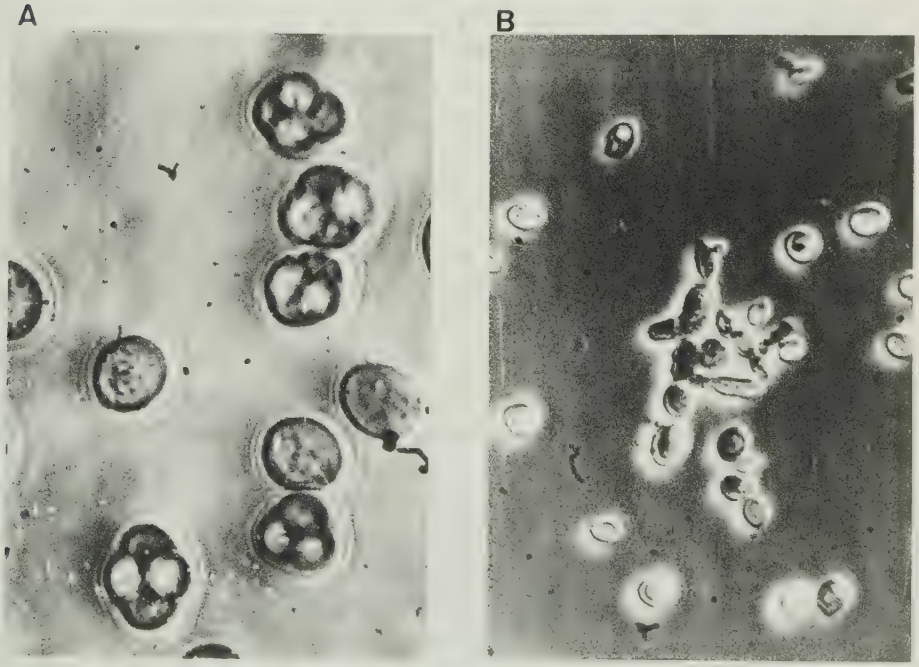


Abb. 4: A) Sporulationsverhalten von Wildtypzellen (Stamm D19.6) und B) Mutantenzellen Stamm D19.6#1568) nach dreitägiger Inkubation auf Sporulationsmedium.

3. 2. Allelietest der hex1^{r}-Mutanten

Um die hex1^{r}-Mutation auf Allelie zum Strukturgen der Hexokinase PII, HXK2, zu testen, sollten die diploiden Mutanten zur Sporulation gebracht werden. Die isolierten haploiden Segreganten sollten danach gegen hxk2-Mutanten gekreuzt und auf Ausfall der Glucose-Repression getestet werden. Aber im Gegensatz zu diploiden Zellen mit völligem Ausfall der Hexokinase PII sporulierten die meisten hex1^{r}-Mutanten nicht. 15 Mutanten zeigten keine Veränderung unter Sporulationsbedingungen. 14 Mutanten bildeten große unförmige Zellen (Abb. 4). 5 Mutanten bildeten zwar Asci; die Sporen waren aber nicht lebensfähig. Eventuell beeinflußt die regulatorische Funktion der Hexokinase PII auch die Sporulation, sofern es sich nicht um eine durch die Mutagenisierung bedingte Sporulationsstörung handelte. Nur bei der Mutante D19.6#877 konnten lebende Sporen isoliert werden. Die Segreganten von 20 Tetraden wurden auf Hexokinaseaktivität und Glucose-Repression getestet (Tab.2). Alle zeigten einen Repressionsausfall. Da der Ausgangsstamm in den Genen MAL2-8^{c} und SUC3 heterozygot war, besaß nur je die Hälfte der Segreganten Maltase- bzw. Invertaseaktivität. Etwa die Hälfte der Segreganten besaß Hexokinase PII-Aktivität, codiert vom hex1^{r}-Gen, die übrigen hatten keine Hexokinaseaktivität. Das Ergebnis zeigte, daß die Mutation, die den Ausfall der Glucose-Repression verursacht, im Gen der Hexokinase PII liegt oder eng damit gekoppelt ist. Die hex1^{r}-Segreganten zeigten kein normales Paarungsverhalten. Nach der Kreuzung gegen verschiedene Stämme wuchsen jeweils nur Einzelkolonien statt des zu erwartenden Zellrasens. Die entstandenen Diploiden wurden sporuliert, ihre Segreganten zeigten alle normale Repression. Offenbar führt die hex1-877^{r}-Mutation zur Sterilität; gepaart haben nur einzelne Zellen, die im hex1^{r}-Gen revertiert waren. Offenbar beeinflußt das hex1^{r}-Allel also auch die Paarung.

Spezifische Aktivitäten nach Anzucht auf YEP 4% Glucose (U/mg Protein)

Segregeante	Maltase	Invertase	Hexokinase Glucose	Fructose	Q F/G
1A	267	146	4	b.d.	-
1B	13	119	6	b.d.	-
1C	237	1145	533	581	1,09
2A	18	4653	237	258	1,08
2B	324	4343	21	b.d.	-
2C	371	2820	58	b.d.	-
3A	6	296	21	b.d.	-
3B	120	3266	7	b.d.	-
3C	77	1798	579	708	1,22
3D	15	104	348	502	1,44
4A	10	1709	418	547	1,31
4B	470	193	82	b.d.	-
4C	191	144	46	b.d.	-
5A	16	1698	233	280	1,20
5B	481	1645	680	823	1,21
6A	284	1807	407	564	1,39
7A	11	228	28	b.d.	-
7B	42	2108	233	279	1,20
8A	24	2170	306	390	1,27
9A	399	3330	24	b.d.	-
9B	266	2840	16	b.d.	-
10A	370	1824	308	368	1,20
10B	132	1181	398	435	1,10
10C	219	2078	258	341	1,32

Tab. 2: Segreganten von D19.6#877: Spezifische Enzymaktivitäten auf YEP 4% Glucose-Medium

Zum Allelietest mußten daher die diploiden Mutanten gegen haploide Stämme zu triploiden Hefen gekreuzt werden. Zur Paarung wird dabei eine Mutation in den Diploiden vorausgesetzt, die zur Paarungstyphomozygotie (a/a oder alpha/alpha) führt (Mortimer und Hawthorne, 1969). Da die Wahrscheinlichkeit dafür der zur Reversion eines Aminosäurebedürfnisses entspricht, müssen beide Kreuzungspartner jeweils mindestens zwei komplementäre Auxotrophien aufweisen, um die Expression von Revertanten auszuschließen. Einigen der haploiden Kreuzungspartner fehlte das MAL2-8^c- oder das SUC3-Gen. Daher muß bei den Triploiden der unterschiedliche Gendosiseffekt berücksichtigt werden, da die Ausprägung bei nur einem derartigen Gen in der triploiden Zelle auch bei ausgefallener Repression weniger deutlich ist. In allen Kreuzungen, bei denen der haploide Kreuzungspartner ein intaktes Hexokinase PII-Gen besaß, war die Glucose-Repression wieder normal. Dagegen blieb die Repression nach Kreuzung gegen Stämme mit defektem hxk2-Gen ausgefallen, auch wenn ein intaktes HXK1-Gen in der Triploiden vorhanden war (Tab. 3). Damit verhielten sich die hex1^r-Mutanten auch im Allelietest im Repressionsverhalten wie die hex1-Mutanten. Das zeigt, daß die hex1^r-Gene tatsächlich allel zum hex1-Gen sind, ihre Mutation also im Strukturgen der Hexokinase PII liegt.

Zur vorläufigen biochemischen Charakterisierung wurden Rohextrakte der Mutanten durch Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf Hexokinaseaktivität angefärbt. Die Hexokinasebande der Mutanten zeigte die gleichen Laufeigenschaften wie die von unmutierter Hexokinase PII (Abb. 5). Die Mutationen verursachten vermutlich keine merkliche Veränderung der Gesamtladung des Enzyms.

Die Aktivitätsanfärbung zeigte, daß in den Rohextraktelektrophoresen des Stammes D19.6, der nur Hexokinase PII in intakter Form enthält, zwei Banden mit Hexokinaseaktivität auftauchten. Das Phosphorylierungsverhältnis Q F/G entsprach bei beiden Banden dem

Stamm	Haploider Kreuzungspartner	Spezifische Aktivität auf 2% Glucosemedium				
		Maltase	Invertase	Hexokinase Glucose	Hexokinase Fructose	Q F/G
D19.6 (HEX1/hex1)	H.38-4B (HXK1 HEX1)	1- 2	17- 23	634-653	834-944	1,31-1,46
D19.6 # 880 (hex1/hex1)		1- 2	23- 28	528-542	763-853	1,44-1,58
D19.6 #777 # 877 # 936 #1568 #1804 (hex1/hex1^r)		1- 7	21- 38	525-632	775-951	1,48-1,52
D19.6 (HEX1/hex1)	308.14A-11C (HXK1 hex1)	2- 3	19- 25	618-633	725-742	1,17-1,19
D19.6 # 880 (hex1/hex1)		2- 5	28- 39	516-535	725-741	1,39-1,42
D19.6 # 777 # 877 # 936 #1568^r #1804 (hex1^r/hex1)		3- 12	25- 53	499-610	699-738	1,21-1,40
D19.6 (HEX1/hex1)	hxk.0-3B und hxk.0-7C	2- 4	18- 24	310-337	327-382	1,05-1,12
D19.6 # 880 (hex1/hex1)	(hxk1 hex1)	99-186	839-1210	158-172	b.d.	b.d.
D19.6 # 777 # 877 # 936 #1568^r #1804 (hex1^r/hex1)		38- 85	578-1411	311-431	214-356	0,74-1,32
D19.6 (HEX1/hex1)	hxk0.P1-2C und hxk0.P1-9D	1- 3	16- 26	531-566	825-873	1,55-1,65
D19.6 # 880 (hex1/hex1)	(HXK1 hex1)	175-332	1004-1423	198-223	547-570	2,48-2,89
D19.6 # 777 # 877 # 936 #1568 #1804 (hex1^r/hex1)		40-111	1006-1715	243-529	440-843	1,72-2,14

Tab. 3: Allelietests der diploiden hex1^r-Mutanten nach Kreuzung zu Triploiden.

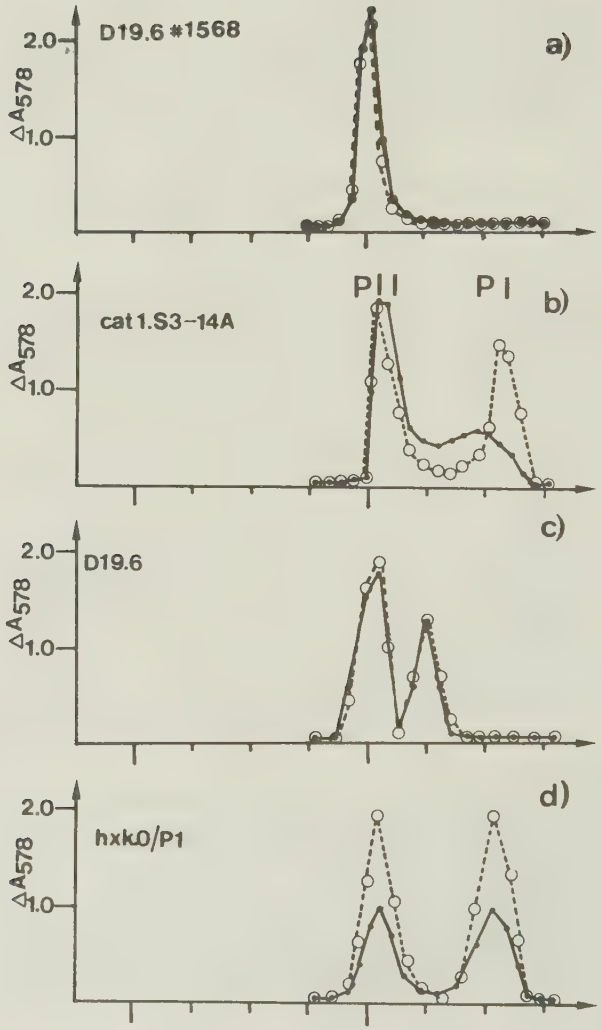


Abb. 5: Anfärbung auf Hexokinaseaktivität nach Polyacrylamidgelelektrophorese: a) D19.6#1568 (diploide Mutante mit hexl^{r}-Gen), b) catl.S3-14A (haploider Wildtypstamm), c) D19.6 (diploide Mutante mit homozygotem PI-Defekt), d) hxk.0/PI (diploide Mutante mit homozygotem PII-Defekt).

des Isoenzyms PII, aber die eine Bande lief im Gel wie PII; die andere lag zwischen PI und PII. Offenbar hatte sich ein gemischtes Dimer aus PI und PII gebildet, in dem allein die Hexokinase PII aktiv war. In diesem Fall muß die hxk1-Mutation unbedingt im Strukturgen liegen. Dasselbe konnte für die hex1-Mutation gezeigt werden. In einem diploiden Stamm, der nur aktive Hexokinase PI produzieren konnte, wurden in der Aktivitätsanfärbung der Rohextrakt-Elektrophoresen ebenfalls zwei Banden detektiert. Beide zeigten das Phosphorylierungsverhältnis Q F/G des Isoenzyms PI; eine Bande entsprach aber in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit der PII. Dies gemischte Dimer besaß also die Aktivität der Hexokinase PI, aber das Laufverhalten der PII.

3. 3. Klonieren des Strukturgens der Hexokinase PII

3. 3.1 Selektion der HXK2-Klone

Um ein einzelnes Gen in Hefe zu transformieren und zu isolieren, geht man von einem Genpool aus, der das gesamte Genom des Spenders in Fragmenten enthält. Diese Fragmente sind in einen Vektor eingebaut, der die Replikation in Hefe ermöglicht. Damit jedes Gen im Genpool wenigstens einmal in voller Länge vorhanden ist, müssen die Fragmente einander überlappen. Um das zu erreichen, verwendet man eine Restriktionsendonuclease, die eine Basensequenz von 4 Basen erkennt und daher auf 256 Basenpaare statistisch eine Schnittstelle besitzt. Man verdaut die DNA nur unvollständig mit diesem Enzym und beendet die Reaktion, wenn die entstandenen Fragmente eine Durchschnittslänge von etwa 5 kBp (Kilobasenpaaren) erreicht haben. Der Vektor wird mit einem Restriktionsenzym aufgeschnitten, das die gleichen überstehenden Enden ("protruding ends") erzeugt, wie sie die einzubauenden Fragmente aufweisen. Um zu verhindern, daß sich der aufgeschnittene Vektor bei der Ligation ohne Einbau eines chromosomalen Fragments wieder schließt, entfernt man die Phosphatreste an den 5'-Enden mit einer bakteriellen alkalischen Phosphatase (BAP) oder einer Phos-

phatase aus Kälberdarm (CIP). Die T_4-Ligase verbindet nur DNA-Stränge, die ein 5'-Phosphat besitzen. Eine Selbstligation des Vektors wird so verhindert. Bei der Ligation mit den chromosomalen Fragmenten können nur die 3'-Enden des Vektors ligiert werden. Es entsteht ein hybrides Plasmid mit zwei Einzelstrangbrüchen ("nicks"). Es läßt sich normal in Escherichia coli transformieren. In der Zelle werden die Strangbrüche repariert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Plasmid YRp7 als Vektor benutzt, das die autonome Replikation in Hefe und Escherichia coli erlaubt. Es wurde mit der Restriktionsendonuclease BamHI im Tetracyclinresistenzgen aufgeschnitten, und mit der Endonuclease Sau3A erzeugte Fragmente hineinligiert. Dadurch ist das Resistenzgen zerstört, und Bakterientransformanten mit diesen Plasmiden sind weiterhin gegen Tetracyclin empfindlich. Enthält der Genpool zusätzlich Vektormoleküle ohne Insert, so ist ein Teil der erzeugten Transformanten tetracyclinresistent. Das Ampicillinresistenzgen bleibt bei der Ligation intakt und ermöglicht die Selektion der Transformanten in Escherichia coli. Die Anzahl der unabhängigen Klone bestimmt die Qualität des Genpools. Um mindestens 95% des Hefegenoms abzudecken, sind 10 000 tetracyclinsensitive, ampicillinresistente Klone erforderlich.

Zum Klonieren des HXK2-Gens wurde ein YRp7-Genpool verwandt, der von C. Denis stammt und von M. Ciriacy zur Verfügung gestellt wurde. Um Hexokinaseklone selektionieren zu können, wurde der Genpool in den Hefestamm hxk.0-9C transformiert, dessen beide Hexokinasegene defekt waren und der eine trp1-Mutation besaß. Die Hefesphaeroplasten wurden zur Ausprägung der plasmidcodierten Gene 90 Minuten auf Glucosemedium inkubiert. Selektioniert wurde auf einem Medium ohne Tryptophan, das Fructose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt. Die Atmung der Hefe wurde mit Antimycin vergiftet. Wachsen konnten nur Zellen, die ein intaktes TRP1-Gen und wenigstens ein funktionsfähiges Hexokinasegen besaßen. Da die gleichzeitige Reversion zweier Gene unwahrscheinlich ist, konnten nur Transformanten wachsen, deren Plasmid neben dem TRP1-Gen des

Vektors YRp7 auch ein Hexokinasestrukturgen enthielt. Auf 30 Platten wurden insgesamt 3×10^7 lebensfähige Zellen plattiert. Bei dieser Selektion wurden über 100 Kolonien isoliert. Sie wurden auf YEP 4% Fructose-Medium mit 2 ppm Antimycin A angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und auf Hexokinase-, Maltase- und Invertaseaktivität getestet. Alle Hefen hatten eine spezifische Hexokinaseaktivität von 15 000 - 20 000 U/mg Protein mit einem Verhältnis von Fructose- zu Glucosephosphorylierung Q F/G von 1,1 - 1,3. Das wies darauf hin, daß alle Transformanten die Hexokinase PII enthielten.

3. 3.2 Biochemische Charakterisierung der Klone

Die Enzymaktivität war gegenüber einem Wildtypstamm um den Faktor 25, gegenüber einem Stamm mit dem Genotyp hxk1 HXK2, der also ebenfalls nur Hexokinase PII enthält, sogar um den Faktor 50 erhöht. Offenbar liegt das Plasmid in hoher Stückzahl in der Zelle vor und wird normal transkribiert. Die Hexokinase läßt sich sogar in Polyacrylamid-Elektrophoresegelen von Rohextrakten nach Proteinanfärbung als deutliche Bande mit den gleichen Wanderungseigenschaften wie isolierte Hexokinase PII erkennen. In Rohextrakten von Wildtypzellen ist an dieser Position keine Bande zu sehen (Abb. 6). Wurden die Elektrophoresegele auf Hexokinaseaktivität angefärbt, so war nur eine Bande zu sehen, die mit der Hexokinase PII-Bande eines Wildtyprohextrakts von der Position her übereinstimmte (Abb. 7).

Die hohe Hexokinase PII-Aktivität ermöglicht auch eine schnelle Reinigung des Enzyms. Nach einer Säurefällung und einer Säulenchromatographie an DEAE Sephacel ließ sich eine spezifische Aktivität von 400 U/mg erreichen. Entsprechend gereinigtes Enzym aus dem rekombinanten Stamm hex1.19D-11A erreichte nur 40 U/mg. Das gereinigte Enzym besaß einen isoelektrischen Punkt von 4,6, wie durch Chromatofokussierung bestimmt wurde und entspricht damit dem für Hexokinase PII angegebenen Wert (Kopetzki und Entian, 1982).

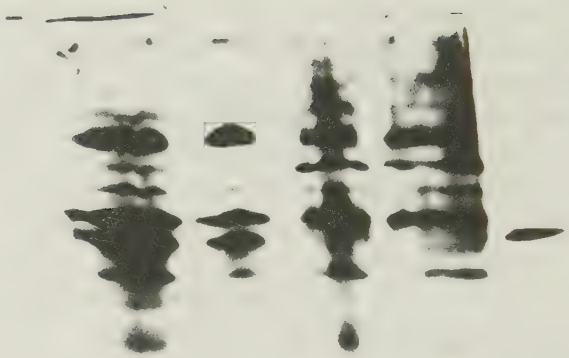


Abb. 6: Polyacrylamidelektrophorese von Heferohextrakten: YRp/HXK2-2 Transformant (a 3 mg Protein, b 0,75 mg Protein), Wildtyp catl.S3-14A (c 3 mg Protein, d 0,75 mg Protein) und gereinigte Hexokinase PII (e 0,04 mg Protein).

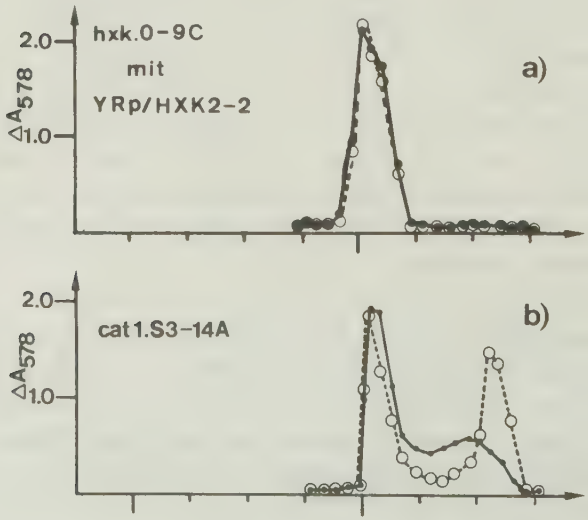


Abb. 7: Anfärbung auf Hexokinaseaktivität nach Polyacrylamidgelelektrophorese von Rohextrakten aus a) HXK2-Transformant und b) Wildtyphefe.

Im Repressionsverhalten verhielten sich die Transformanten uneinheitlich. Einige zeigten eine vollständige Wiederherstellung der Glucose-Repression, andere aber noch eine teilweise Erhöhung der Maltase- und Invertaseaktivität. Dies liegt daran, daß YRp7-Plasmide in Hefe instabil sind und zum Teil bei der Zellvermehrung verloren werden. Daher wurden alle getesteten Hefen auch auf ihren Plasmidgehalt getestet. Dazu wurden sie auf Vollmedium plattiert und danach auf Selektionsmedium abgestempelt. Das Verhältnis der Kolonieanzahl unter selektiven zu der unter nicht-selektiven Bedingungen ergibt den Anteil der plasmidhaltigen Zellen. Es stellte sich heraus, daß die Höhe der Maltase- und Invertaseaktivität mit dem Plasmidverlust korreliert war (Tab. 4). Die Erhöhung der Maltase- und Invertaseaktivität wird also durch die Zellen verursacht, deren Repression nach Plasmidverlust ausgefallen ist. Da die Transformanten mit Fructose als einziger Kohlenstoffquelle wuchsen und ihre Atmung mit Antimycin A vergiftet war, muß die Energie für die Derepression durch die Vergärung von Reservekohlenhydraten bereitgestellt werden. Tatsächlich ist in einer Hefe mit Defekten in beiden Hexokinase- und dem Glucokinasegen die Fermentation von Reservekohlenhydraten beobachtet worden. Während des exponentiellen Wachstums auf Ethanol als Kohlenstoffquelle wurden bis zu 25 µMol intrazelluläre Glucose pro Gramm Protein festgestellt (Entian und Dröll, pers. Mitteilung). Mit der Glucokinase konnten die Transformanten nach Plasmidverlust diese intrazelluläre Glucose vergären und offenbar so die zur Derepression notwendige Energie erzeugen.

3. 3.3 Reklonieren der isolierten Plasmide

Bei der Hefetransformation ist nur ein geringer Teil der eingesetzten Zellen zur DNA-Aufnahme kompetent; d. h., nur wenige Zellen sind in der Lage, Plasmide aufzunehmen. Jede dieser Zellen nimmt dafür aus dem angebotenen Genpool eine große Anzahl von Plasmiden auf. Transformiert man z.B. eine Mischung aus zwei verschiedenen Plasmiden, so enthalten praktisch alle Zellen, die

Trans-formante	Typ des Plasmid	Spez. Aktivität auf YEP 2% Fructose (mU/mg Protein) Maltase	Invertase	Hexokinase Glucose	Fructose	QF/G	% Zelle ohne P midver
Untrans-formiert	keins	214,3	3 389	48	b.d.	-	0
17	YRp/HXK2-1	17,5	325	21 700	27 200	1,25	84
28	YRp/HXK2-1	27,1	395	21 150	26 130	1,24	76
5	YRp/HXK2-1	86,2	870	22 800	27 800	1,22	48
8	YRp/HXK2-1	145,1	1 995	19 900	26 200	1,32	18
21	YRp/HXK2-2	14,1	235	15 350	23 000	1,50	88
27	YRp/HXK2-2	77,5	515	19 500	23 500	1,21	54
31	YRp/HXK2-2	171,9	2 345	20 200	26 900	1,33	14
124	YRp/HXK2-3	17,5	270	2 400	2 900	1,21	85
129	YRp/HXK2-3	31,4	455	2 500	3 150	1,26	79
120	YRp/HXK2-3	36,1	515	2 090	2 740	1,31	74
103	YRp/HXK2-4	15,7	322	16 700	20 800	1,25	86
116	YRp/HXK2-4	34,4	366	22 100	24 300	1,10	76
142	YRp/HXK2-5	21,1	195	24 400	36 500	1,50	88
152	YRp/HXK2-5	35,8	512	25 600	31 400	1,23	71
161	YRp/HXK2-6	25,2	240	16 200	21 200	1,31	81
159	YRp/HXK2-6	29,5	306	19 200	24 100	1,26	75
170	YRp/HXK2-7	18,4	275	16 400	24 000	1,46	84
171	YRp/HXK2-7	32,2	418	16 500	19 900	1,21	75
P/2	YRp/HXK1-1	98,4	1 630	660	2 090	3,17	82
P/19	YRp/HXK1-1	110,1	1 480	800	2 150	2,69	86

Tab. 4: Eigenschaften der Hefetransformanten

das eine Plasmid aufgenommen haben, auch das andere (Stinchcomb et al., 1979). Die isolierten Transformanten enthalten außer dem für Hexokinase codierenden Plasmid auch noch andere, meist auch den Ausgangsvektor YRp7. Um den Anteil der unerwünschten Plasmide zu verringern, zieht man die Hefetransformanten vor der Isolierung der Plasmide auf YEP Fructose-Medium an. Dadurch entfällt die Selektion auf das TRP1-Gen, das alle Plasmide des Genpools besitzen. Die Plasmide gehen beim Zellwachstum verloren; nur das Plasmid mit dem Hexokinase-Gen muß erhalten bleiben, weil die Zelle sonst ihre Fähigkeit verliert, auf Fructose als Kohlenstoff-Quelle zu wachsen. Aus dieser Anzucht werden die Plasmide isoliert und in Escherichia coli transformiert. Die selektierten ampicillinresistenten Kolonien werden auf Tetracyclinplatten abgestempelt. Das Auftreten tetracyclinresistenter Kolonien weist darauf hin, daß die Hefe noch intakten Ausgangsvektor enthalten hat, also noch nicht alle Plasmide ohne Hexokinasegen verloren wurden.

Auf diese Weise wurden aus 35 Hefetransformanten tetracyclinsensitive Bakterienklone isoliert. Die enthaltenen Plasmide wurden isoliert, mit der Restriktionsendonuclease EcoRI geschnitten und die Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Alle 35 Plasmide ließen sich zwei Typen zuordnen, die YRp/HXK2-1 und YRp/HXK2-2 genannt wurden. Das Plasmid YRp/HXK2-1 enthielt ein Insert mit einer Länge von 5,0 kBp und einer EcoRI-Schnittstelle; 15 der Hefetransformanten enthielten dies Plasmid. Die anderen 20 Hefetransformanten lieferten das Plasmid YRp/HXK2-2 mit einem Insert von 7,0 kBp und drei EcoRI-Schnittstellen im Insert (Abb. 8). Den endgültigen Beweis, daß die isolierten Plasmide das HXK2-Gen enthalten, lieferte die Retransformation in Hefe. Dazu wird das Plasmid aus einem einzelnen Bakterienklon isoliert und in die Hefe hxk.0-9C transformiert. Weil von einem definierten Plasmid ausgegangen wird, ist gewährleistet, daß nicht ein unbemerkt mittransformiertes Plasmid für die gesuchte Eigenschaft verantwortlich ist. Aus den so erzeugten Hefetransformanten konnten wieder die Plasmide YRp/HXK2-1 und YRp/HXK2-2 isoliert werden.

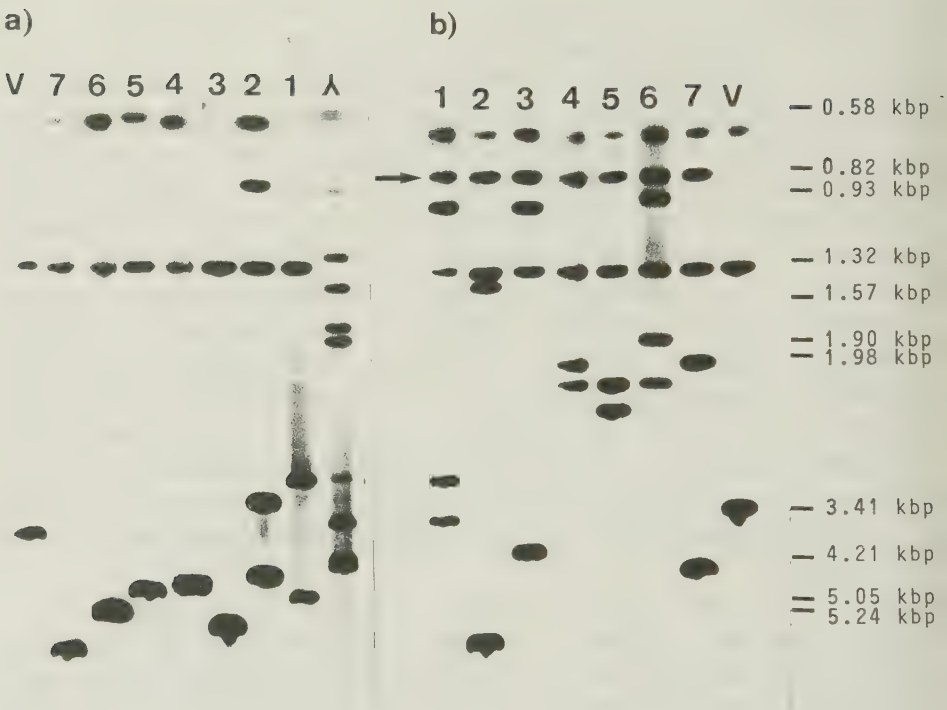


Abb. 8: Agarose-Gelelektrophoresen nach Verdau des Vektors YRp7 und der HXK2-Plasmide mit a) EcoRI, b) HindIII und PstI. Der Pfeil markiert das gemeinsame Fragment der HXK2-Plasmide. Auftrag 1 - 7 entspricht den Plasmiden YRp/HXK 2-1 bis 2-7; V bezeichnet den Auftrag des Vektors YRp7 und λ den des Lambda-Standards.

3. 4. Southern-Transfer und Southern-Hybridisierung

Um zu zeigen, daß die Inserts der beiden Plasmide identische Sequenzen enthielten, wurden sie gegeneinander hybridisiert. Dazu werden die denaturierten (einsträngigen) Fragmente des einen Plasmids fest an ein Nitrocellulose-Filter gebunden und das andere, zuvor radioaktiv markierte Plasmid in Lösung mit dem Filter inkubiert. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen bindet das mar-

kierte Plasmid nur an Fragmente mit der gleichen oder einer sehr ähnlichen Sequenz. Die gebundene Radioaktivität wird durch eine Autoradiographie nachgewiesen (Southern, 1975). Da beide Plasmide den Vektor YRp7 und damit unabhängig vom Insert identische Sequenzen enthalten, müssen die Vektorsequenzen durch Restriktionsschnitte vollständig vom Insert entfernt werden.

Durch Verdau der beiden Plasmide mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI, HindIII, PstI und SacI zeigte sich, daß alle diese Restriktionsenzyme beide Inserts schneiden. Durch eine Kombination von je zwei Enzymen lassen sich Insertfragmente erzeugen, die keine Sequenzen des Vektors umfassen. YRp/HXK2-1 wurde mit HindIII und PstI bzw. mit HindIII und SacI verdaut, YRp/HXK2-2 mit SacI und EcoRI bzw. mit SacI und HindIII. Die Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, im Gel denaturiert und auf ein Nitrocellulose-Filter transferiert (Southern-Transfer, Southern-Blot). Durch Trocknen bei 65°C wurde die DNA fest an das Filter gebunden.

Zur Herstellung radioaktiv markierter "probe" wurde in die Plasmide YRp/HXK2-1 bzw. YRp/HXK2-2 mit Hilfe der DNA-Polymerase I alpha-thio ^{35}S-dATP eingebaut. Die Polymerase, die in Escherichia coli als Reparaturenzym dient, verlängert 3'-Hydroxylreste in doppelsträngiger DNA und baut zugleich als 5' nach 3'-Exonuclease DNA-Stränge mit freiem 5'-Ende ab. Bei allen Plasmidpräparationen treten bei der Lagerung Einzelstrangbrüche ("nicks") auf. Durch ihre beiden Aktivitäten läßt die DNA-Polymerase I den Einzelstrangbruch am Gegenstrang entlangwandern und baut dabei Nucleotide aus angebotenen Nucleotidtriphosphaten ein ("nick-translation"; Rigby, 1977). Auch das dATP-Analogon alpha-thio-dATP wird von der Polymerase eingebaut; die entstehende DNA ist radioaktiv, mit bis über 10^{10} cpm/mg. Nicht in die DNA eingebaute Radioaktivität läßt sich durch Gelfiltration an Sephadex G100 entfernen.

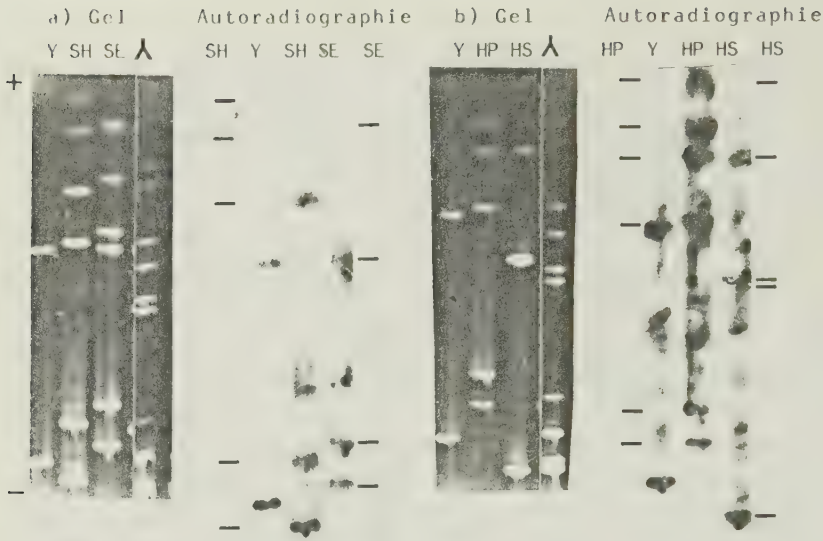


Abb. 9: Hybridisierung von a) YRp/HXK2-1 gegen SacI/HindIII- (SH) u
SacI/EcoRI- (SE) geschnittenen YRp/HXK2-2 und von b) YRp/HXK
gegen HindIII/PstI- (HP) und HindIII/SacI- (HS) geschnittene
YRp/HXK2-1. Gel ≙ Ethidiumbromidgefärbte DNA-Fragmente im
Agarosegel; Autoradiographie: nach Southern-Hybridisierung.
Y ≙ EcoRI-verdauter YRp7; λ ≙ Lambda-Standard

Die Nitrocellulosefilter mit den denaturierten DNA-Fragmenten wurden mit den markierten Plasmiden inkubiert (Southern-Hybridisierung). Dabei bestimmen die Temperatur und die Pufferbedingungen die Selektivität der Hybridisierung. Unter den gewählten strengen Bedingungen (siehe Material und Methoden 2.8) binden nur sehr homologe Sequenzen an die DNA im Filter. In der Autoradiographie zeigte sich, daß alle Fragmente des Plasmids YRp/HXK2-1, die im Agarosegel zu detektieren waren, mit YRp/HXK2-2 hybridisierten. Im Gegensatz dazu hybridisierten zwei SacI/EcoRI- und

ein SacI/HindIII-Fragment von YRp/HXK2-2 nicht mit YRp/HXK2-1 (Abb. 9; Tab. 5). Die Hybridisierung bewies, daß beide Plasmide homologe Sequenzen im Insert besaßen. Die Tatsache, daß unterschiedliche Plasmide mit homologem Insert isoliert wurden, bestätigt die Annahme endgültig, daß diese Plasmide tatsächlich das Strukturgen der Hexokinase PII enthalten. Das vollständige Gen mußte sich in dem bei beiden Plasmiden identischen Bereich befinden. Die nicht hybridisierenden Bereiche von YRp/HXK2-2 mußten außerhalb dieser Sequenzen liegen. Diese Information erleichtert das Erstellen der Restriktionskarte.

YRp/HXK2-1 verdaut mit HindIII und PstI							
Fragment (kBp)	0,25	0,65	0,83	0,99	1,4	3,35	3,9
reines Insertfragment			+			+	
Hybrid mit YRp/HXK2-2	+	+	+	+	+	+	+

YRp/HXK2-1 verdaut mit HindIII und SacI					
Fragment (kBp)	0,65	0,98	1,73	1,79	5,5
reines Insertfragment		+		+	
Hybrid mit YRp/HXK2-2	+	+	+	+	+

YRp/HXK2-2 verdaut mit SacI und HindIII						
Fragment (kBp)	0,54	0,65	0,87	1,3	3,7	5,0
reines Insertfragment	+			+	+	
Hybrid mit YRp/HXK2-1	+	+	+	-	+	+

YRp/HXK2-2 verdaut mit SacI und EcoRI							
Fragment (kBp)	0,63	0,85	0,95	1,34	1,45	3,15	3,95
reines Insertfragment			+	+		+	
Hybrid mit YRp/HXK2-1	+	+	-	-	+	+	+

Tab. 5: Hybridisierung der Plasmidfragmente von YRp/HXK2-1 gegen Plasmid YRp/HXK2-2 und der Fragmente von YRp/HXK2-2 gegen Plasmid YRp/HXK2-1.

3. 5. Restriktionskartierung der Plasmide YRp/HXK2-1 und YRp/HXK2-2

Von jedem der beiden Plasmidtypen wurde eine Restriktionskarte erstellt. Dazu wurden die durch isopyknische Zentrifugation im Cäsiumchloridgradienten gereinigten Plasmide mit einem oder zwei Restriktionsenzymen verdaut und die entstehenden Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Standard wurde ein mit EcoRI und HindIII verdauter Lambdaphage eingesetzt. Durch Auftragen der Wanderungsgeschwindigkeit der Lambda-Fragmente gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichts läßt sich eine Eichgerade konstruieren, aus der die Größe der Plasmidfragmente abgelesen werden kann. Durch Vergleich der Verdaus mit verschiedenen Restriktionsenzymen läßt sich die Lage der Restriktionsschnittstellen auf dem Plasmid bestimmen. Plasmide mit einer Größe von 5 - 20 kBp lassen sich auf diese Weise mit Restriktionsenzymen kartieren, die eine Kennsequenz von 6 Basen haben und daher nicht mehr als etwa 10 Fragmente erzeugen. Bei einer größeren Zahl an Fragmenten läßt sich mit dieser Methode keine eindeutige Karte mehr konstruieren. Auch wenn zwei Schnittstellen eines Restriktionsenzyms zu nahe beieinander liegen, etwa dichter als 100 Bp, läßt sich das entstehende Fragment nicht im Agarosegel detektieren; eine Schnittstelle wird übersehen. Ein Teil der Restriktionsenzyme schneidet nicht, wenn eine Base ihrer Kennsequenz methyliert ist. Wenn eine Schnittstelle nur in einem Teil der Plasmidmoleküle methyliert vorliegt, so treten zusätzliche Fragmente ("partials") auf, die die Kartierung erschweren. Auch wenn der Restriktionsverdau unvollständig war, treten zusätzliche Fragmente auf.

Die beiden Hexokinaseplasmide wurden mit 16 verschiedenen Restriktionsendonucleasen untersucht (AvaI, BamHI, BclI, BglI, BglII, EcoRI, HincII, HindIII, HpaI, KpnI, PstI, SacI=SstI, SalI, SmaI, SphI, XorII). Dabei schnitten die Enzyme BamHI, BclI, BglII, HpaI und SmaI keins der beiden Inserts. HincII und SalI besitzen keine Schnittstelle im Insert von YRp/HXK2-1, BglI keine

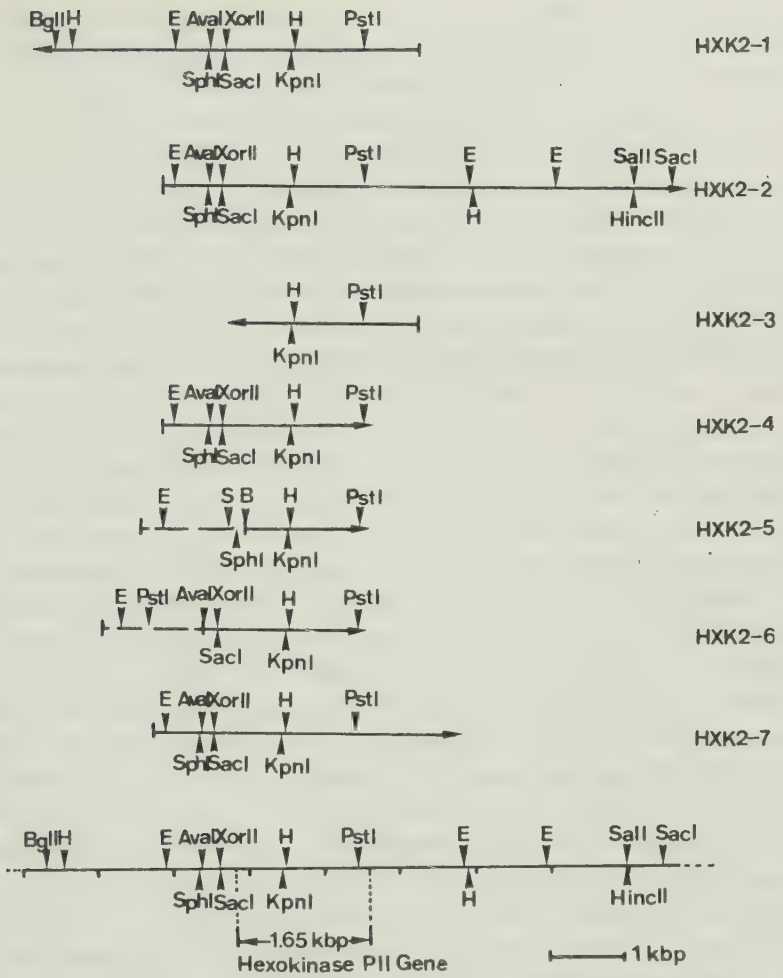


Abb. 10: Restriktionskarte der Inserts der YRp/HXK2-Plasmide. Der Pfeil gibt die Orientierung des Inserts im Vektor an. Die Inserts HXK2-5 und HXK2-6 enthalten zusätzlich Fragmente des Vektors YRp7. Eine zusammengesetzte Genkarte ist unten in der Abbildung dargestellt. E ≙ EcoRI, H ≙ HindIII, B ≙ BamHI, S ≙ SalI.

im Insert von YRp/HXK2-2. Die Inserts überlappen sich in einem Bereich von 3,5 kBp. Sie sind bezüglich des Vektors entgegengesetzt orientiert (Abbildungen 8, 10).

3. 6. Subklonieren des HXK2-Gens

Die Hexokinase PII besteht aus identischen Monomeren vom Molekulargewicht 50 000. Nach Anderson et al. (1978) beträgt die Aminosäureanzahl pro Untereinheit etwa 460. Es ist deshalb zu erwarten, daß das Strukturgen mit regulierenden vor- und ev. nachgeschalteten Sequenzen dann ungefähr 1,6 - 1,8 kBp lang ist. Um das Gen genauer zu lokalisieren und so auch das Sequenzieren zu erleichtern, wurde das Plasmid YRp/HXK2-2 subkloniert. Dazu wurde es mit Sau3A partiell verdaut, wobei die durchschnittliche Fragmentgröße bei 2 kBp lag. Die entstandenen Fragmente wurden wie bei einer Genpoolherstellung in BamHI-geschnittenen YRp7 ligiert, in Escherichia coli transformiert und die Plasmide isoliert. Dieses Plasmidgemisch wurde in die Hefemutante hxk.0-9C transformiert und Hexokinase-Transformanten selektioniert. Die Plasmide wurden aus der Hefe isoliert und in Escherichia coli transformiert. Aus den Bakterien konnten 5 neue Plasmide mit Insertlängen zwischen 2,4 und 4,1 kBp isoliert werden, die YRp/HXK2-3 bis YRp/HXK2-7 genannt wurden. Sie ließen sich alle in Hefe retransformieren. Der Plasmidverlust in Hefe lag für diese Plasmide bei etwa 20%, während er bei YRp/HXK2-1 und -2 unter gleichen Bedingungen bis zu 85% betragen hatte. Vermutlich sind kleine Plasmide in Hefe stabiler als große. Die Maltase- und Invertaseaktivität nach Glucose-Anzucht war in allen neuen Transformanten niedrig. Die Glucose-Repression war also wieder voll hergestellt. Fast alle Plasmide führten in Hefe zu einer Hexokinase-Aktivität von etwa 20 U/mg Protein. Nur Transformanten mit YRp/HXK2-3 besaßen etwa 3 U Hexokinase/mg (Tab. 4). Da der aus Hefe stammende Teil des Inserts von YRp/HXK2-5 vollständig in YRp/HXK2-3 enthalten ist, dieses Plasmid aber auch die hohe Hexokinase-Aktivität erzeugte, kann nicht das eventuelle Fehlen eines regulierenden Genteils allein die Ursache für die niedrigere Aktivität bei

YRp/HXK2-3 sein. YRp/HXK2-3 unterscheidet sich aber von allen anderen Plasmiden außer YRp/HXK2-1 in seiner Orientierung im Vektor. Wie sich herausstellte, wird das Hexokinasegen in den anderen Plasmiden von der Seite aus transkribiert, die dem TRP1-Fragment benachbart ist. Eventuell liegt dort eine zusätzliche Bindungsstelle für die RNA-Polymerase. Das gleich orientierte Plasmid YRp/HXK2-1 führt jedoch auch zu hoher Hexokinaseaktivität. Im Unterschied zu YRp/HXK2-3 ist es aber sehr viel länger und könnte zusätzliche regulatorische Sequenzen, die die hohe Aktivität verursachen, enthalten. Unmittelbar vor dem Gen können diese Sequenzen aber nicht liegen, da die Inserts von YRp/HXK2-1 und -3 dort identisch sind.

Von den neu isolierten Plasmiden wurde eine Restriktionskarte erstellt (Abb. 10). Es zeigte sich, daß die Plasmide YRp/HXK2-5 und -6 aus mindestens 3 Fragmenten ligiert sein mußten; neben dem Vektor und dem Insertfragment wurde noch jeweils ein Sau3A-Fragment des Vektors YRp7 eingebaut, jeweils 1,4 kBp lang, aber verschiedenen Ursprungs. Außerdem sind die Inserts von YRp/HXK2-4 bis -7 nicht in die BamHI-Stelle des zur Ligation zugegebenen Vektors eingebaut, sondern sind durch Selbstligation nach dem partiellen Sau3A-Schnitt entstanden. Daher fehlen ihnen Teile des Tetracyclin-Resistenzgens. Dabei sind die Inserts HXK2-4, -5 und -6 nicht nur am Genende gleich, sondern sie sind auch in die gleiche Sau3A-Schnittstelle hinter dem Tetracyclin-Resistenzgen ligiert. Der Vektor ist um etwa 2 kBp verkleinert; es fehlen die SphI-, die SalI- und die AvaI-Stelle des Vektors. Bei YRp/HXK2-7 ist der Vektor um 450 Bp verkürzt, das Insert endet in der Sau3A-Stelle bei Base 824 im pBR322-Teil. Dadurch fehlen die SphI- und die SalI-Stelle des Vektors. Durch die Ligation ist in YRp/HXK2-5 eine BamHI-Stelle entstanden, die es ermöglicht, das Insert auf dieser Seite exakt auszuschneiden. Alle Plasmide überlappen sich in einem Bereich von 1,65 kBp Länge, in dem eine HindIII- und eine PstI-Stelle liegen. In diesem Bereich muß das vollständige HXK2-Gen liegen; es läßt sich also sehr genau lokalisieren (Fröhlich et al., 1984).

Um herauszufinden, ob im Bereich des HXK2-Gens ein Hefe-Replikationsorigin liegt, wurde das Plasmid YRp/HXK2-3 mit EcoRI geschnitten und religiert. Isoliert wurde ein Plasmid, dem das TRP1-Fragment mit dem darauf lokalisierten Origin fehlte. Dies Plasmid wurde aus Escherichia coli isoliert und in die Hefe hxk.0-9C transformiert. Als Kontrolle wurde das vollständige YRp/HXK2-3 eingesetzt. Selektioniert wurde nur auf die Fähigkeit, mit Fructose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Während bei den YRp/HXK2-3-Transformanten unter diesen Bedingungen über 200 Kolonien wuchsen, ließen sich bei dem Plasmid ohne das TRP1-Fragment keine Transformanten isolieren. Dies Plasmid wird offenbar in Hefe nicht autonom repliziert. Nahe dem HXK2-Gen befindet sich also kein Replikationsorigin.

3. 7. Klonieren des HXK1-Gens

Obwohl der zur Hefetransformation eingesetzte Genpool von C. Denis aus einer Hefe stammt, die beide Hexokinase-Gene enthielt, konnte nur das Gen HXK2 isoliert werden. Auch aus zwei weiteren Genpoolen (Pool von J. Heinisch und eigener Pool aus dem Stamm catl.S3-14A) konnten nur Plasmide mit HXK2 als einzigem Hexokinasegen isoliert werden. Offensichtlich läßt sich das Gen der Hexokinase PI schlechter klonieren, eventuell weil zu seiner Funktion größere regulatorische Nachbarsequenzen erforderlich sind. Es ist auch möglich, daß im Gen gelegene Schnittstellen für das Restriktionsenzym Sau3A bevorzugt gegenüber den Schnittstellen neben dem Gen verdaut werden, so daß das Gen beim DNA-Verdau meist zerstört wurde. Die große Zahl der bei der Selektion auftretenden Hexokinase PII-Klone erschwert dann die Detektion der wenigen, möglicherweise auch langsamer wachsenden Hexokinase PI-Klone. Daher wurde zur Isolierung des HXK1-Gens ein Genpool aus dem Hefestamm H.38-1B angelegt. Dieser Stamm besitzt nur eine intakte Hexokinase PI, während das Strukturgen der Hexokinase PII mutiert ist. Aus diesem Genpool isolierte Hefeklone mit Hexokinaseaktivität müssen daher das Isoenzym PI besitzen. Um die Zerstörung des Gens

beim Restriktionsschnitt der DNA möglichst unwahrscheinlich zu machen, wurde der partielle Verdau mit Sau3A bei einer Fragmentgröße von ca. 15 kBp statt wie üblich 5 kBp abgebrochen.

Bei der Selektion auf Hefetransformanten wurden zwei Klone isoliert, während bei einem Wildtyp-Genpool als Kontrolle 600 Kolonien wuchsen. Die Klone besaßen eine Hexokinaseaktivität von 0,8 - 1 U/mg Protein mit Glucose und 2 - 3 U/mg mit Fructose als Substrat. Das Verhältnis Q F/G lag bei 2,4 - 3,2. Die Klone enthielten also tatsächlich die Hexokinase PI. Die gegenüber den PII-Klonen deutlich niedrigere Aktivität muß nicht eine Eigenschaft des HXK1-Gens oder seiner Regulation sein, sondern kann auch dadurch verursacht sein, daß das sehr große Plasmid nur in geringer Stückzahl pro Zelle vorliegt. Die Maltase- und Invertaseaktivität war auch in den Klonen mit geringem Plasmidverlust hoch; die Glucose-Repression wurde also durch das HXK1-Gen nicht wieder hergestellt, obwohl die Hexokinaseaktivität in der Zelle deutlich höher ist als in Wildtyphefen (Tab. 4). Das bestätigt erneut die These, daß nicht eine zu geringe Phosphorylierungskapazität zum Ausfall der Glucose-Repression führt, sondern das Fehlen des Isoenzyms PII.

Aus den HXK1-Klonen wurden die Plasmide isoliert und in Escherichia coli transformiert. Aus beiden Hefeklonen wurde das gleiche Plasmid YRp/HXK1-1 isoliert. Es ließ sich in Hefe retransformieren und wieder unverändert aus Escherichia coli isolieren. Das Plasmid hatte eine Insertlänge von 15,5 kBp, also eine Gesamtlänge von über 20 kBp. Diese Größe erschwert sowohl die Isolierung als auch die Analyse des Plasmids. Zur Restriktionskartierung wurden die Restriktionsendonucleasen EcoRI, HindIII und PstI eingesetzt. PstI besaß keine Schnittstelle im Insert von YRp/HXK1-1. Dagegen liegt eine PstI-Stelle innerhalb des HXK2-Gens. EcoRI schnitt im Insert HXK1-1 dreimal, HindIII viermal (Abb. 11). Möglicherweise entspricht eine der HindIII-Stellen der in der HXK2-Sequenz.

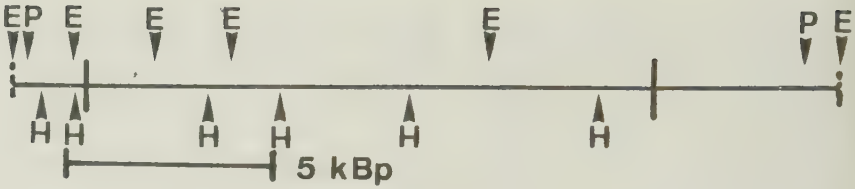


Abb. 11: Restriktionskarte des Plasmids YRp/HXK1-1. I bezeichnet Beginn und Ende des Inserts. Schnittstellen: E ≙EcoRI, H ≙ HindIII, P ≙ PstI.

3. 8. Birnstiel-mapping des HXK2-3 Inserts

3. 8.1 Strategie des Birnstiel-mapping

Zum Vorbereiten des Sequenzierens nach Maxam und Gilbert und zum Ordnen der sequenzierten Fragmente ist es wichtig, eine Restriktionskarte mit den beim Sequenzieren eingesetzten Enzymen zu erstellen. Da für die Sequenzierung die einzelnen Schnittstellen nicht weiter als höchstens 200 - 250 Basenpaare entfernt sein sollten, ist man auf Restriktionsenzyme angewiesen, die eine Sequenz von 4 Basen erkennen und daher im Durchschnitt alle 256 Basenpaare schneiden. Um diese Restriktionsstellen kartieren zu können, benutzt man das Verfahren von Smith und Birnstiel (1976), das sog. "Birnstiel-mapping". Dazu isoliert man das zu kartierende Fragment durch Restriktionsverdau und präparative Elektrophorese, entfernt seine 5'-Phosphatreste mit einer Phosphatase und verestert dort mit der T_4-Kinase und gamma^{32}P-ATP einen ^{32}P-Phosphatrest. Durch einen Restriktionsschnitt, der das Fragment in mindestens zwei Teile schneidet, und eine präparative Elektrophorese werden die beiden markierten Enden getrennt. Das zu untersuchende Ende wird aus dem Gel isoliert und einem fraktionierten partiellen Verdau mit dem zu kartierenden Restriktionsenzym unterworfen. Dazu werden zu verschiedenen Zeiten Aliquots aus dem Reaktionsgemisch entfernt und der Verdau durch eine Phenolextraktion beendet. Die vereinigten Proben werden auf einem Agarosegel

elektrophoretisch aufgetrennt und eine Autoradiographie angefertigt. Von allen beim partiellen Verdau entstandenen Fragmenten sieht man nur die, welche am markierten 5'-Ende beginnen. Man erhält ein leiterartiges Bandenmuster, aus dem sich die Entfernungen der einzelnen Schnittstellen vom 5'-Ende leicht ablesen lassen. Auch die relative Lage der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme läßt sich eindeutig bestimmen, wenn man die verschiedenen Verdaus nebeneinander auf das Gel aufträgt. Nur wenn zwei Schnittstellen eines Restriktionsenzyms sehr dicht zusammen liegen, mit weniger als ca. 20 Basenpaaren Abstand, werden sie auch im "Birnstiel-mapping" als eine Bande gelesen und so eine Schnittstelle übersehen.

3. 8.2 Synthese von gamma^{32}P-ATP

Das zum Markieren der DNA benötigte gamma^{32}P-ATP sollte aus ^{32}P-Phosphat und ATP nach Glynn und Chappell (1964) synthetisiert werden. Bei dieser Synthese wird das 3-Phosphoglycerat mit dem ATP in der Lösung zu 1,3-Diphosphoglycerat phosphoryliert, das unter Abspaltung von Phosphat zu Glycerinaldehyd 3-Phosphat reduziert wird. Läuft die Reaktion in Gegenrichtung, so wird im Endeffekt das eingesetzte ^{32}P-Phosphat in gamma-Stellung in ATP eingebaut. Man läßt die Reaktion bis zum Erreichen des Gleichgewichts laufen, in dem sich das markierte und das letzlich aus dem zugegebenen ATP stammende Phosphat gleichmäßig auf ATP und freies Phosphat verteilt haben. Der maximal erreichbare Einbau von ^{32}P in ATP hängt vom Verhältnis von ATP zum eingesetzten Phosphat ab und beträgt unter den verwendeten Bedingungen 78%. Um Ausbeuten dieser Größenordnung zu erreichen, wurde das Verfahren modifiziert.

Die zu diesen Reaktionen nötigen Enzyme 3-Phosphoglycerat Kinase und Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase liegen als Ammoniumsulfat-Präzipitate vor. Da Ammoniumionen die T$_4$-Kinase hemmen und am Ende der Synthese nicht abgetrennt werden, müssen die Enzyme vor der Benutzung vom Ammoniumsulfat befreit werden. In der Ori-

ginalvorschrift wurde die Enzymsuspension zentrifugiert und das Pellet erst mit Wasser gewaschen und dann in Wasser gelöst. Das so gereinigte Enzym zeigte nur noch wenig Aktivität; dagegen waren die Ammbniumionen nicht vollständig entfernt. Daher wurden die Enzyme durch eine Zentrifugation in Hohlfaserschläuchen vollständig und ohne Aktivitätsverlust vom Ammoniumsulfat gereinigt (nach Kopetzki). Dazu wurden 5 µl (22,5 U) Phosphoglycerat Kinase und 10 µl (10 U) Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase in eine ca. 10 cm lange Schlaufe eines Hohlfaserschlauchs mit der Ausschlußgrenze von 10 000 D pipettiert, 200 µl ATP-Synthesepuffer zugegeben und der Schlauch in einem mit Puffer gefüllten Szintillationsgläschen in der Christ-Labofuge 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Dabei wurde die Probe auf etwa 10 µl konzentriert. Die Enzymlösung wurde anschließend noch zweimal in 200 µl Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die gesamte Enzymlösung wurde zur Synthese eingesetzt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch eine Dünnschichtchromatographie auf Polyethylenimincellulose-Platten überprüft. Mit 0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 3,5 als Laufmittel besitzt Phosphat einen Rf von 0,65, ADP einen von 0,45, ATP einen von 0,25 und DNA bleibt an der Auftragsstelle liegen. Die Methode ist daher auch geeignet, den Einbau von Radioaktivität in DNA zu messen. Bei der gamma^{32}P-ATP-Synthese konnten etwa 60% des angebotenen ^{32}P-Phosphats in ATP eingebaut werden.

ATP und Phosphat lassen sich an einer DEAE-Sephacel-Säule trennen. Phosphat bindet in TE-Puffer nicht an den Ionenaustauscher, während ATP mit 1 M NaCl eluiert wird. Nachteil der Methode ist, daß das ATP anschließend in einer Lösung mit hohem Salzgehalt vorliegt. Das läßt sich durch die Verwendung des flüchtigen Puffers Triethanolaminocarbonat (TEAC) vermeiden. In 10 mM TEAC pH 7,5 binden Phosphat und ATP an DEAE-Cellulose. Eluiert wird mit einem TEAC-Gradienten von 10 mM - 1 M. Phosphat wird bei 150 mM eluiert, ATP bei 800 mM. Durch Lyophilisation kann das ATP vollständig vom Puffer befreit werden.
Das zur Maxam-Gilbert-Sequenzierung eingesetzte gamma^{32}P-ATP wurde von Amersham-Buchler bezogen.

3. 8.3 Markieren der DNA

Zum Kartieren nach Birnstiel wurde das Plasmid YRp/HXK2-3 eingesetzt. Je 10 µg wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI, SalI bzw. AvaI verdaut. Die 5'-Phosphatreste wurden mit einer Phosphatase abgespalten. Dazu ist die bei der Genpoolherstellung benutzte alkalische bakterielle Phosphatase weniger geeignet, da sie sich nicht durch Erhitzen inaktivieren läßt, so daß trotz Phenolextraktion noch aktive Phosphatase bis in die Kinasereaktion geschleppt wird. Phosphatase aus Kälberdarm dagegen läßt sich durch 15minütiges Erhitzen auf 68°C vollständig inaktivieren. Besonders hitzeempfindlich ist sie in Gegenwart von Trinitriloessigsäure, die Zink-Ionen bindet und so das Enzym destabilisiert.

In der Kinasereaktion wurden zum Birnstiel-mapping mit 20 µCi gamma^{32}P-ATP 20 000 - 30 000 cpm pro Ende in die DNA eingebaut. Dabei ließ sich in von EcoRI erzeugte Enden deutlich mehr einbauen als nach AvaI- oder SalI-Verdau. Um die markierte DNA von nicht umgesetztem ATP zu trennen, wurden verschiedene Methoden verwandt. Durch zehnmaliges Zentrifugieren durch Hohlfaserschläuche mit einem Ausschlußvolumen von 50 000 D ließ sich das ATP quantitativ abtrennen. Allerdings blieb ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität dauerhaft im Schlauch, vermutlich DNA, die sich in den Poren festgesetzt hatte. Die Trennung ist auch durch Zentrifugation durch eine Sephadex G50-Säule oder durch Fraktionierung an einer Sephadex G75-Säule möglich. Am einfachsten ist die Abtrennung des nicht umgesetzten ATP durch Fällen der DNA mit 2 M Ammoniumacetat und 2 Volumina Ethanol. Das ATP bleibt im Überstand und wird durch dreimaliges Fällen quantitativ entfernt.

3. 8.4 Durchführung des Birnstiel-mappings

Die am EcoRI-Ende markierten Plasmide wurden mit SalI, die am SalI- oder AvaI-Ende markierten mit EcoRI nachgeschnitten. Die Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Insertfragmente ausgeschnitten und elektroeluiert. Je 2000 - 3000 cpm des markierten Fragments wurden mit 1 µg unmarkierter DNA und 1 U Restriktionsenzym inkubiert. Nach 0, 3, 6, 10, 17, 25, 35 und 60 Minuten wurden Aliquots entnommen und der Verdau durch Phenolextraktion gestoppt. Die Ansätze wurden in einem 1,4%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel getrocknet und eine Autoradiographie mit einer Expositionsdauer von 5 Tagen angefertigt (Abb. 12). Als Standard wurde mit EcoRI und HindIII geschnittene Lambda-Phagen-DNA genommen, die mit 10 µCi gamma^{32}P-ATP markiert war. Aus den Banden ließen sich die einzelnen Schnittstellen genau kartieren (Abb. 13). Dabei zeigten sich als kritische Bereiche für das Sequenzieren das Sau3A-Sau3A-Fragment ganz am Anfang des Inserts, nahe dem TRP1-Gen, mit einer Länge von 280 Bp und das HpaII-Sau3A- und das Sau3A-Sau3A-Fragment am Insertende mit 295 bzw. 285 Bp. Da keins der benutzten Restriktionsenzyme in diesen Fragmenten eine Schnittstelle aufwies, waren weitere Restriktionsenzyme zum Sequenzieren notwendig.

Zur Überprüfung der konstruierten Feinkarte wurde das unmarkierte Insert mit HpaII und TaqI allein und in Kombination mit PstI und HindIII geschnitten (Abb. 14). Beim TaqI-Verdau treten viele schwache Banden durch unvollständigen Verdau auf, da TaqI bei einer Methylierung des Adeninrests in der Kennsequenz nicht schneidet. Offenbar wird das Hefeinsert in Escherichia coli an bestimmten Stellen unvollständig methyliert. Alle Fragmente des Insertverdaus ließen sich aus der Restriktionskarte ableiten; der Verdau bestätigte also das Ergebnis des Birnstiel-mappings.

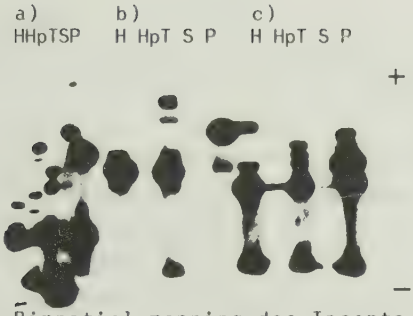


Abb. 12: Birnstiel-mapping des Inserts von YRp/HXK2-3. Autoradiographie der partiellen Verdaus mit H ≙ HindIII, P ≙ PstI, Hp ≙ HpaII, S ≙ Sau3A, T ≙ TaqI bei markiertem a) EcoRI-, b) SalI- und c) AvaI-Ende.

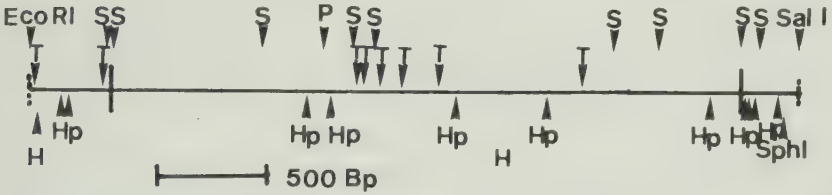


Abb. 13: Restriktionsfeinkarte des Insertbereichs von YRp/HXK2-3.

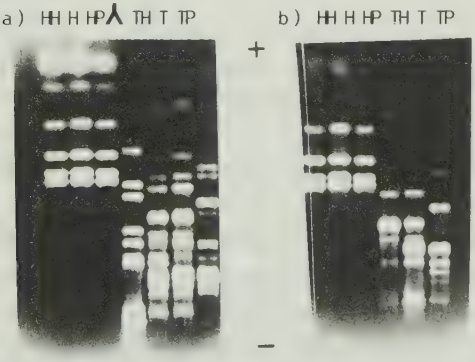


Abb. 14: DNA-Anfärbung des a) EcoRI/AvaI- und des b) EcoRI/SalI-Insertfragments nach Verdau mit HpaII und TaqI allein (H bzw. T) und in Kombination mit HindIII (HH bzw. TH) und PstI (HP bzw. TP). λ ≙ Lambda-Standard

3. Sequenzieren nach Maxam und Gilbert (1977, 1980)

3. 9.1 Konstruktion des Plasmids YRp/HXK2-8

Beim Sequenzieren geht man von einem DNA-Fragment aus, das den zu sequenzierenden Bereich enthält. Da im Endeffekt das gesamte Fragment sequenziert wird, sollte es möglichst klein sein. Daher wurde aus den vorhandenen Plasmiden ein neues konstruiert, das es erlaubt, das HXK2-Gen in einem kleinen Fragment zu isolieren. Dazu wurde Plasmid YRp/HXK2-3 mit KpnI und SalI aufgeschnitten und das entstandene große Fragment isoliert. Aus YRp/HXK2-5 wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen das 800 Bp-Fragment, das die BamHI-Stelle enthält, herausgeschnitten, isoliert und in das große Fragment von YRp/HXK2-3 ligiert. Das entstandene Plasmid YRp/HXK2-8 wurde in den Hefestamm hxk.0-9C transformiert, wo es das Wachstum mit Fructose ermöglichte. Das HXK2-Gen ist in diesem Plasmid also intakt enthalten.

Das Plasmid wurde aus der Hefe in Escherichia coli übertragen und daraus isoliert. Es hat eine Länge von 7,5 kBp. Mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI läßt sich das HXK2-Gen in einem Fragment von 2,76 kBp isolieren, mit EcoRI und SphI sogar in einem Fragment von 2,68 kBp. Dadurch war das Plasmid YRp/HXK2-8 ideal für das Sequenzieren des HXK2-Gens. Für bestimmte Bereiche wurden aber auch die Plasmide YRp/HXK2-3 und YRp/HXK2-5 eingesetzt.

3. 9.2 Isolierung der Inserts von YRp/HXK2-3 und YRp/HXK2-8

Zur Isolierung der Inserts wurde YRp/HXK2-3 mit EcoRI und SalI und YRp/HXK2-8 mit EcoRI und BamHI verdaut. Außerdem wurden durch Schnitte mit HindIII, PstI und SalI Insertfragmente von YRp/HXK2-3 erzeugt. Die DNA-Fragmente wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die Anfärbung mit Ethidiumbromid und die anschließende UV-Einwirkung zu einer Vernetzung der DNA-Stränge führt, wurden die Banden durch Fluoreszenzlöschung loka-

lisiert. Dazu wird das Gel auf eine Chromatographieplatte mit Floureszenzindikator gelegt. Im UV-Licht bei 254 nm sieht man die DNA-Banden dunkelblau vor hellerem Hintergrund. Die Methode ist allerdings viel unempfindlicher als die Ethidiumbromidfärbung. Nur Mengen über 1 µg DNA pro Bande lassen sich erkennen. Die gesuchten Banden wurden ausgeschnitten und elektroeluiert. Aus 300 µg Plasmid lassen sich 25 - 30 µg Insert isolieren.

3. 9.3 Prinzip und Durchführung des Sequenzierens nach Maxam und Gilbert

Wie beim Kartieren nach Birnstiel geht man bei der Maxam-Gilbert-Sequenzierung von einem Restriktionsfragment aus, das man an beiden Enden radioaktiv markiert. Zum Sequenzieren sollte auch die PstI-Stelle im Insert benutzt werden. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Restriktionsenzymen erzeugt PstI überstehende 3'-Enden, dadurch sind die 5'-Enden verdeckt ("recessed"). Sie lassen sich nur nach Denaturierung mit T_4-Kinase markieren. Die Ausbeute pro Ende betrug bei 200 µCi eingesetztem gamma^{32}P-ATP 100 000 cpm; in die überstehenden ("protruding") Enden, die durch die anderen Enzyme erzeugt waren, wurden mit 100 µCi ^{32}P-ATP 2 - 500 000 cpm eingebaut.

Die beiden markierten Enden des Fragments müssen getrennt werden. Da die DNA in den eigentlichen Sequenzierungsreaktionen nicht als Doppelstrang vorliegen muß, ist dies außer durch einen Restriktionsschnitt auch durch die Trennung der beiden Einzelstränge möglich. Dazu wird der Doppelstrang denaturiert und auf ein nicht denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen. Während der Elektrophorese falten sich die beiden Stränge durch Basenpaarung innerhalb des Strangs zu spezifischen Strukturen, die oft unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten haben (Abb. 15). Unter denaturierenden Bedingungen, z.B. 7 M Harnstoff im Gel, wandern gleichlange Einzelstränge auch gleichschnell. Es läßt sich nicht voraussagen, welcher der beiden Einzelstränge bei der Strangtrennung schneller

läuft. Daher muß man anschließend beide Stränge sequenzieren, auch wenn man nur an einem Ende interessiert ist. Überhaupt eignet sich die Methode der Strangtrennung eher für den Beginn einer Sequenzierung. Dabei schneidet man das gesamte Insert mit einem Restriktionsenzym, markiert und trennt die Stränge. Bis zu einer Länge von 300 Basenpaaren ist dazu ein 8% Acrylamidgel geeignet, bei 200 bis 1000 Basenpaaren ein 5% Acrylamidgel und bei Fragmenten von mehr als 1 kBp ein Agarosegel. Ein Teil der Fragmente trennt sich nicht, weil die beiden Einzelstränge ähnliche Wanderungsgeschwindigkeiten besitzen. Man kann also meist nur einige der Restriktionsfragmente sequenzieren. Für die gezielte Sequenzierung ist das Nachschneiden des markierten Fragments besser geeignet, da sich voraussagen läßt, wie das gesuchte Fragment läuft und ob es sich von anderen Fragmenten trennen läßt. Für das Nachschneiden ist es Voraussetzung, daß das Fragment mindestens eine Restriktionsstelle enthält, die das Fragment asymmetrisch unterteilt und nicht zu nahe am zu sequenzierenden Ende sitzen darf. Außerdem muß mit einem anderen Fragment über diese Schnittstelle hinweg sequenziert werden, um sicherzustellen, daß es sich nicht um mehrere, dicht zusammenliegende Stellen handelt. Besonders bei kleinen Fragmenten läßt sich die Sequenzierung oft nur durch eine Strangtrennung durchführen.

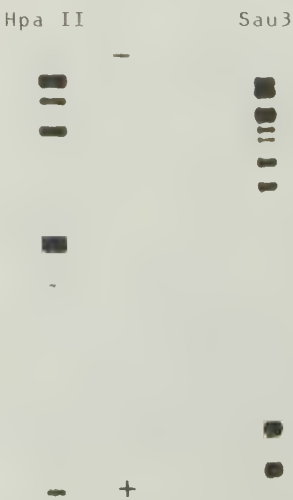


Abb. 15: Strangtrennungsgel
Autoradiographie der strang-
getrennten Hpa II- und
Sau3A-Fragmente des Inserts
von YRp/HXK2-3

Aus der Restriktionsfeinkarte zeigte sich, daß nur wenige Restriktionsfragmente für einen zweiten Verdau zur Trennung der beiden radioaktiven Enden geeignet waren, in erster Linie die HpaII-, Sau3A- und TaqI-Fragmente, die die HindIII- und die PstI-Stelle des Inserts enthielten. Bei den anderen Fragmenten wäre durch einen zweiten Restriktionsschnitt ein Ende praktisch verlorengegangen, da es sehr kurz abgeschnitten würde. Mehrere TaqI- und Sau3A-Fragmente enthielten überhaupt keine Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme und waren somit nur der Strangtrennung zugänglich. Als weiteres Problem erwies sich die Tatsache, daß Sau3A, HpaII und besonders TaqI durch die unregelmäßige Methylierung des Hefeinserts teilweise nicht schnitten und so eine große Zahl von Fragmenten lieferten, von denen jeweils mehrere auf eine Schnittstelle zuliefen. Jedes einzelne dieser Fragmente war nur wenig markiert, da sich die Radioaktivität über alle Fragmente verteilte. Außerdem lieferten verschiedene Sequenzierungen dieselbe Sequenz. Dabei waren verschiedene Schnittstellen eines Restriktionsenzyms unterschiedlich stark durch Methylierung geschützt. So entstand durch HindIII-Nachschnitt markierter Sau3A-Fragmente nicht das erwartete Bruchstück von 660 Basenpaaren Länge, sondern statt dessen nur das mit 945 Basenpaaren, das von der BamHI-Stelle von YRp/HXK2-5 ausgeht. Ein Vorteil der unvollständigen Schnitte war es, daß es so möglich wurde, mit einem Restriktionsenzym über seine eigene Restriktionsstelle zu sequenzieren. So gelang es, mit einem TaqI-Fragment über die benachbarte TaqI-Schnittstelle hinweg zu sequenzieren.

Um die Nachteile der unvollständigen Restriktionsschnitte zu vermeiden, wurden zusätzlich die Restriktionsenzyme DdeI und HinfI verwendet, die durch Methylierung ihrer Kennsequenz nicht gehemmt werden und bei denen sich unvollständige Fragmentierungen daher vermeiden ließen. Da bereits ein Teil ihrer Schnittstellen im Fragment aus der bis dahin entschlüsselten Sequenz bekannt war, konnte auf eine Feinkartierung mit diesen Restriktionsenzymen verzichtet werden. Sie wurden ausschließlich durch Strangtrennung zum Sequenzieren vorbereitet.

Die gesamte Strategie zur Sequenzierung des HXK2-Gens ist in Abb. 16 und Tabelle 6 dargestellt.

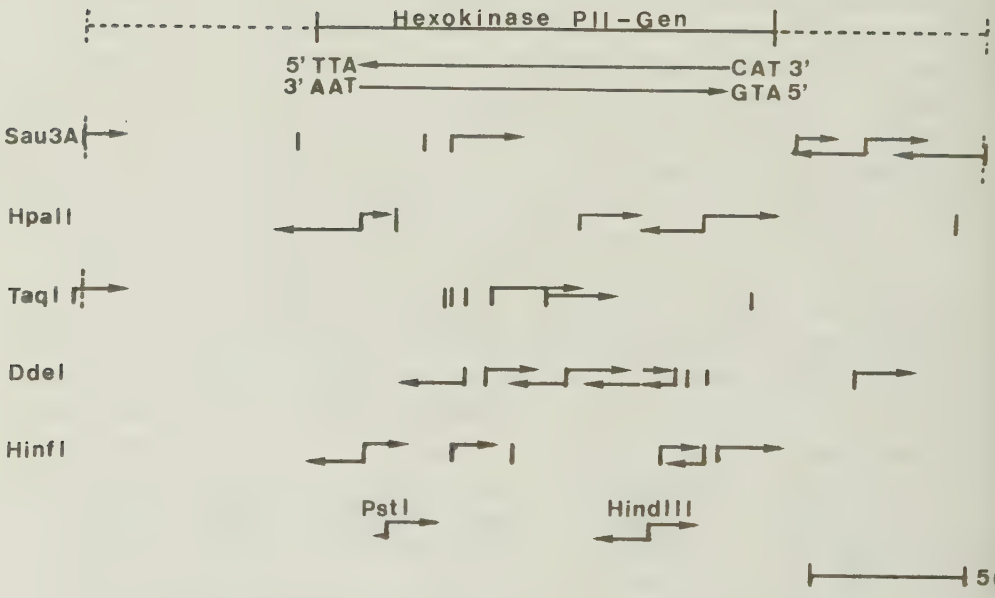


Abb. 16: Strategie der Sequenzierung des Hexokinase PII-Gens. Die gestrichelten Linen bezeichnen Beginn und Ende des Inserts, durchgezogene Linien die des Genbereichs. Die Querstriche geben die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme an, die Pfeile Richtung und Länge der einzelnen Sequenzierung.

sequenziert ab Restriktionsstelle	Base	bis Base	gelesenes Fragment (Basen)
HinfI	183	-29	213
HinfI	220	371	152
HpaII	224	431	208
HpaII	226	-7	234
DdeI	317	428	112
HinfI	385	230	156
HindIII	395	570	176
HindIII	399	232	168
DdeI	431	595	165
DdeI	434	317	118
HpaII	628	447	182
DdeI	665	833	169
DdeI	668	464	205
TaqI	730	505	226
TaqI	808	617	192
DdeI	918	754	165
DdeI	989	1118	130
HinfI	1037	886	152
Sau3A	1048	835	214
PstI	1232	1071	162
PstI	1236	1266	31
HinfI	1311	1498	188
HinfI	1314	1176	139
HpaII	1367	1603	237
HpaII	1369	1244	126

Tab. 6: Sequenziertaktik (Numerierung der Basen: in Transkriptionsrichtung mit 1 ≙ erste Base des Startcodons).

Die isolierten Fragmente wurden aus den Gelen eluiert und an einer DEAE-Sepharosesäule von Verunreinigungen aus dem Gelmaterial gereinigt. Wie bei der Birnstiel-Kartierung wurden sie unvollständigen Spaltungsreaktionen unterworfen. An Stelle einer Spaltung mit Restriktionsenzymen wurde hier durch chemische Reaktionen, die für bestimmte Basen der DNA spezifisch sind, gespalten. Die Reaktionsfolge besteht aus einer spezifischen Modifizierungsreaktion, in der die entsprechende Base labilisiert wird, einer unspezifischen Abspaltung der labilen Basen und einer Spaltung des DNA-Stranges an den Stellen, wo die Basen fehlen. Der Strangbruch und bei den meisten Reaktionen auch die Abspaltung der Base werden durch Erhitzen in Piperidinlösung bewirkt. Diese beiden Reaktionsschritte sollen vollständig ablaufen. Dagegen wurden die Bedingungen für die basenspezifischen Modifizierungsreaktionen so gewählt, daß nur etwa jede hundertste Base modifiziert wurde. Dadurch entstanden anschließend bevorzugt Fragmente zwischen 0 und 300 Basen Länge.

Verwendet wurden Reaktionen, die spezifisch waren für Guanin (G), für Guanin und Adenin (G+A), für Cytidin und Thymidin (C+T), für Cytidin (C), für Adenin und schwächer für Cytidin (A+C) und für Thymidin (T). In der guaninspezifischen Reaktion wird Guanin in 7- und Adenin in 3-Position methyliert. Durch Alkalieinwirkung wird der Imidazolring des 7-Methylguanin geöffnet und die Base abgespalten. Das methylierte Adenin reagiert nicht (Kochetkov und Budovskii, 1972). Durch Säureeinwirkung werden die Purinbasen Guanin und Adenin abgespalten (Lawley, 1966). Durch Hydrazin wird der Pyrimidinring von Cytosin und Thymidin aufgespalten (Singer, 1975); in Gegenwart von 1 M NaCl reagiert nur Cytidin (Lawley und Brookes, 1963). Durch Alkalieinwirkung in der Hitze werden die Ringsysteme von Adenin und Cytidin aufgespalten, wobei Adenin stärker reagiert (Lawley und Thatcher, 1970). Osmiumtetroxyd oxidiert unter alkalischen Bedingungen den Thymidinring (Fried-

mann und Brown, 1978). Da in den für zwei Basen spezifischen Reaktionen doppelt so viele Banden entstehen wie in denen für eine Base, wurde für sie auch die doppelte Menge an radioaktiver DNA eingesetzt. Damit eine Bande nach einer Autoradiographiedauer von wenigen Tagen sichtbar ist, muß sie wenigstens 10 cpm ^{32}P enthalten.

Die Ansätze für die verschiedenen Basen wurden zur Strangtrennung denaturiert und in einem 0,2 mm dicken Acrylamidgel, das 7 M Harnstoff enthält, aufgetrennt (nach Danner et al., 1980). Um eine Renaturierung der DNA zu vermeiden, wurde die Spannung mit 2300 V so gewählt, daß die Geltemperatur bei 50 - 60°C lag. Die einzelnen Fragmente trennen sich nach ihrem Molekulargewicht auf. In der anschließenden Autoradiographie sah man nur die Fragmente, die mit dem markierten Ende beginnen. Für die verschiedenen Reaktionen waren 6 leiterartige Bandenmuster zu erkennen, aus denen sich die Abfolge der Basen direkt ablesen ließ. Die Zahl von sechs verschiedenen Reaktionen bei vier verschiedenen Basen gab eine erhöhte Ablesegenauigkeit und eine Fehlerkontrolle.

Für die Sequenz eines längeren Fragments kombiniert man mehrere Elektrophoresen. Die Basen 1 - 30 liest man aus einem 20% Acrylamidgel, wenn Bromphenolblau als Markierungssubstanz 15 cm weit gelaufen ist. Aus einem 8% Acrylamidgel lassen sich die Basen 20 - 120 lesen, wenn der Marker Bromphenolblau über die volle Gellänge von 40 cm gelaufen ist, und die Basen 75 - 170, wenn der Marker Xylencyanol bis zum Gelende gelaufen ist. Aus einem 6% Acrylamidgel, dessen Xylencyanolmarker 2 x 40 cm gelaufen ist, lassen sich schließlich die Basen 130 - 220 lesen. Die Überlappung der lesbaren Sequenzen um jeweils mindestens 10 Basen ist nötig, um sicherzugehen, daß nicht ein Stück ausgelassen wurde. Im günstigsten Fall ließen sich so aus einer Kombination von vier Gelaufträgen bis zu 220 aufeinanderfolgende Basen ablesen (Abb. 17).

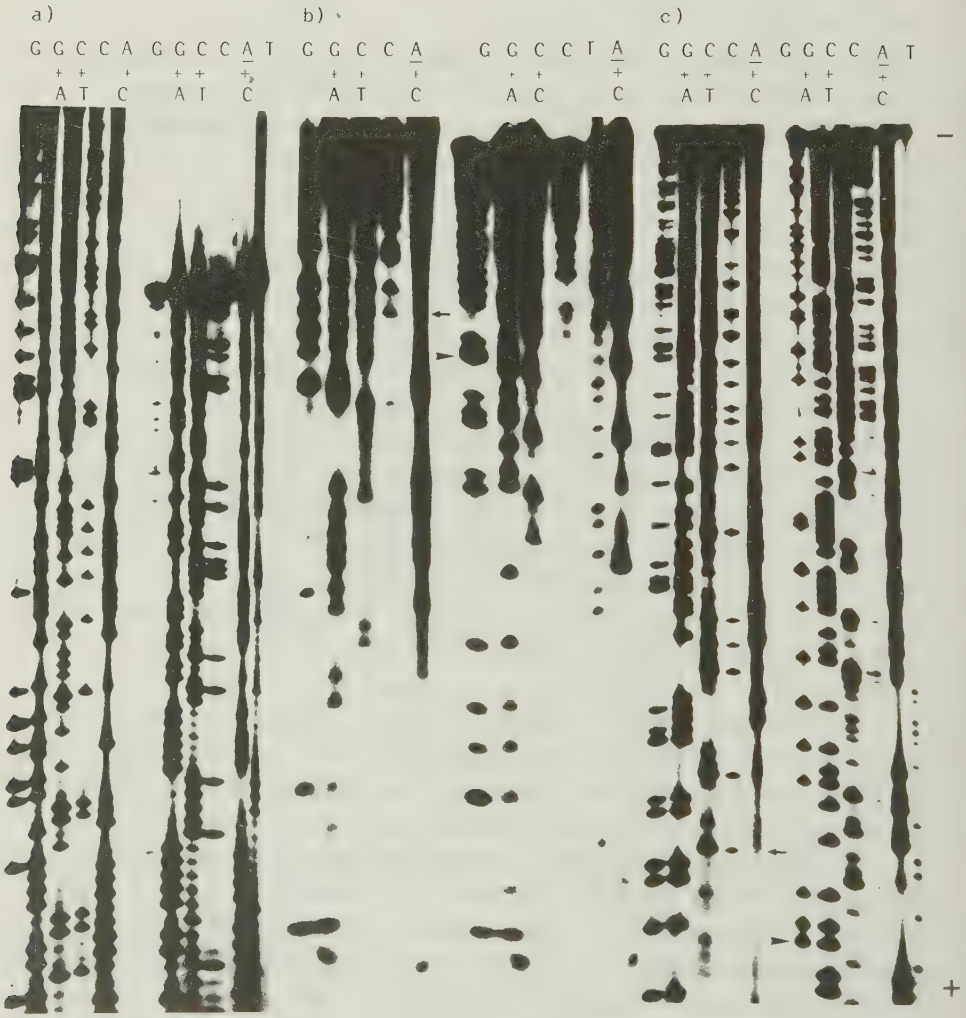


Abb. 20: Sequenziergele

a) 8% Gel mit den DdeI-Fragmenten ab Base 918 gegen Transkriptionsrichtung und ab Base 665 in Transkriptionsrichtung.

b) 20% Gel mit den DdeI-Fragmenten ab Base 668 gegen Transkriptionsrichtung und ab Base 434 gegen Transkriptionsrichtung

c) An b) anschließendes 8% Gel. Die Pfeile markieren den Anschluß der beiden Gele.

G, G+A, C+T, C, A+C und T bezeichnen die jeweils verwendeten Sequenzierungsreaktionen.

3. 9.4 Auswertung der Sequenzgele

Um mehrere Sequenzen zu größeren Einheiten zusammenzusetzen, müssen sich diese ebenfalls um mindestens 10 Basen überlappen. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Sequenz von 10 Basen zweimal vorkommt, ist für ein Fragment von 3 000 Basen Länge 0,3%. Bei dieser Überlappungsgröße kann man also sicher sein, daß die Fragmente tatsächlich unmittelbar aufeinanderfolgen. Diese Regel gilt auch für Sequenzen, die von derselben Restriktionsstelle in die beiden verschiedenen Richtungen laufen. Zum Beweis, daß sie tatsächlich zusammenstoßen, muß man zusätzlich über die Restriktionsstelle hinaus sequenzieren.

Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß auf den Sequenzierungsgelen Kompressionen auftreten können. Sie zeigen sich als auffallend starke Bande in einer Reaktion oder als gleichweit laufende Banden in allen Reaktionen. Sie entstehen durch Basenpaarung innerhalb eines Stranges trotz der denaturierenden Bedingungen, wenn eine längere palindrome Sequenz vorliegt. Eine solche Sequenz besitzt im Doppelstrang eine zweifache Symmetrieachse und kann sich als Einzelstrang zu einer Schlaufe paaren. Da Restriktionsschnittstellen palindrome Sequenzen sind, treten dort bevorzugt Kompressionen auf. Meist läßt sich der entsprechende Gegenstrang aber ohne Kompression lesen.

Nicht jede Kompression ist als solche zu erkennen. Sind nur zwei identische Basen komprimiert, so besteht die Gefahr, daß man sie als eine liest. Eine weitere Unsicherheitsquelle ist das Auftreten von Lücken im Bandenmuster. Normalerweise nimmt der Bandenabstand kontinuierlich von kleinen zu großen Fragmenten ab. Manchmal scheint aber eine Base zu fehlen. Das kann der Effekt einer Kompression sein; aber auch das Auftreten von 5-Methylcytosin führt zu Lücken im Bandenmuster. Es reagiert in den Modifizierungsreaktionen viel schwächer als Cytosin und bildet daher keine sichtbare Bande (Ohmori et al., 1978). Um solche Fehlermöglich-

keiten zu erkennen, ist es nötig, jeden Bereich mindestens doppelt, ausgehend von verschiedenen Restriktionsstellen, zu sequenzieren. Am sichersten ist es, beide Stränge zu sequenzieren, da dann jeder Basenreaktion in einer Sequenz eine völlig andere in der komplementären Sequenz entspricht. So ergibt sich ein 5-Methylcytosin durch ein Guanin im Gegenstrang.

Um aus den einzelnen sequenzierten Fragmenten die Gesamtsequenz zusammenzusetzen, ist es am günstigsten, alle palindromen Sequenzen zu markieren. Einerseits findet man so auch die verschiedenen Restriktionsschnittstellen, so daß sich eine Zuordnung mit Hilfe der Restriktionskarte durchführen läßt. Andererseits sind palindrome Sequenzen für beide komplementäre DNA-Stränge identisch. Daher läßt sich die Verteilung der verschiedenen Palindrome wie ein Fingerabdruck zur Suche nach überlappenden Sequenzen benutzen, sogar ohne daß man die jeweiligen Gegenstränge der abgelesenen Sequenz benötigt (Tab. 7).

Die in der Sequenz gefundenen Restriktionsstellen stimmten mit der Restriktionskarte überein. Außerdem wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme gefunden, die nicht zur Kartierung eingesetzt waren. Eine dieser Restriktionsstellen, eine BstEII-Stelle nahe der HindIII-Stelle, wurde durch Restriktionsschnitte bestätigt.

3.10. Lokalisieren des HXK2-Gens

Auf dem DNA-Doppelstrang ergeben sich durch die zwei Stränge und den Triplettcode sechs mögliche Translationsraster. In fünf von den Rastern liegen die Stop-Codone zufällig verteilt vor, im Schnitt kommt alle 64 Basen ein Stop-Signal. Das Leseraster des HXK2-Gens dagegen weist auf über 1500 Basen kein Stop-Codon auf. Die Suche nach dem Start-Codon AUG wurde dadurch erleichtert, daß die ersten 11 aminoterminalen Aminosäuren der Hexokinase PII sequenziert wurden (Schmidt und Colowick, 1973b). Aus der Aminosäuresequenz Val His Leu Gly Pro Lys Lys Pro Gln Ala Arg ließ

ATGGTTCATT TGGGTCCAAA AAAACCACAA GCTAGAAGAT TTATGCAAGG ATTGATGCAA CAAATTGAGG

ATTTCGAAAA AAATTTCACT GTTCCAACTG AAACTTTACA AGCCGTTACC AAGCATTTCA TTTCCGAATT

GGAAAAGGGT TTGTCCAAGA AGGGTGGTAA CATTCCAATG ATTCCAAGTT GGGTTAATGG ACTTCCCAAA

CTGGCTAAGG ACTCCGGTGA TTTCTTGGCC ATTGATTTGG GTGGTACCAA CTTGAGAGTT GTCTTAGTCA

AGTTGGGCGG TGACCGTACC TTTGACACCA CTCAATCTAA GTACAGATTA CCAGATGCTA TGAGAACTAC

TCAAAATCCA GACGAATTGT GGGAATTTAT TGCCGACTCT TTGAAACCTT TTATTGATGA GCAATTCCCA

CAAGGTATCT CTGAGCCAAT TCCATTGGGT TTCACCTTTT CTTTCCCAGC TTCTCAAAAC AAAATCAATG

AAGGTATCTT GCAAAGATGG ACTAAAGGTT TTGATATTCC AAACATTGAA AACCACGATG TTGTTCCAAT

GTTGCAAAAG CAAATCACCA AGAGGAATAT CCCAATTGAA GTTGTTGCTT TGATAAACGA CACTACCGGT

ACTTTGGTTG CTTCTTACTA CACTGACCCT GAAACTAAGA TGGGTGTTAT CTTCGGTACT GGTGTCAATG

GTGCTTACTA CGATGTTTGT TCCGATATCG AAAAGCTACA AGGAAAACTA TCTGATGACA TTCCACCATC

TGCTCCAATG GCCATCAACT GTGAATACGG TTCCTTCGAT AATGAACATG TCGTTTTGCC AAGAACTAAA

TACGATATCA CCATTGATGA AGAATCTCCA AGACCAGGCC AACAAACCTT TGAAAAAATG TCTTCTGGTT

ACTACTTAGG TGAAATTTTG CGTTTGGCCT TGATGGACAT GTACAAACAA GGTTTCATCT TCAAGAACCA

AGACTTGTCT AAGTTCGACA AGCCTTTCGT CATGGACACT TCTTACCCAG CCAGAATCGA GGAAGATCCA

TTCGAGAACC TAGAAGATAC CGATGACTTG TTCCAAAATG AGTTCGGTAT CAACACTACT GTTCAAGAAC

GTAAATTGAT CAGACGTTTA TCTGAATTGA TTGGTGCTAG AGCTGCTAGA TTGTCCGTTT GTGGTATTGC

TGCTATCTGT CAAAAGAGAG GTTACAAGAC CGGTCACATC GCTGCAGACG GTTCCGTTTC AACGAGATAC

CCAGGTTTCA AAGAAAAGGC TGCCAATGCT TTGAAGGACA TTTACGGCTG GACTCAACCT CATCTAGACG

ACTACCCAAT CAAGGTTGTT CCTGCTGAAG ATGGTTCCGG TCCTGGTGCC GCTGTTATTG CTGCTTTGGC

CCAAAAAAGA ATTGCTGAAG GTAAGTCCGT TGGTATCATC GGTGCTTAA

Tab. 7a: Verteilung der palindromen Sequenzen (Sequenz), der palindromen Restriktionsstellen (Sequenz) und der nicht-palindromen Schnittstellen (Sequenz, z.B. bei DdeI) im HXK2-Gen

Restriktions-enzym	Kennsequenz	Anzahl der Schnittstellen	Lage der Schnittstellen (Base Nr.)
Restriktionsenzyme mit 6 Basen Kennsequenz			
AsuII	TT/CGAA	1	73
BalI	TGG/CCA	2	238 781
EcoRV	GAT/ATC	2	726 846
HindIII	A/AGCTT	1	395
KpnI	GTTAC/C	1	257
PstI	CTGCA/G	1	1236
XbaI	T/CTAGA	1	1323
Restriktionsenzyme mit 4 Basen Kennsequenz			
AluI	AG/CT	3	397 468 1162
EcoRI	AATT	10	61 81 133 364 373 412 437 593 922 1123
HaeIII	GG/CC	4	238 781 937 1400
HpaII	C/CGG	4	224 626 1220 1367
RsaI	GT/AC	4	255 297 322 952
Sau3A	/GATC	2	1044 1127
TaqI	T/CGA	5	74 728 806 995 1037 1052
Restriktionsenzyme mit nicht-palindromer Kennsequenz			
AvaII	G/GXCC	1	1369
BstEII	GGTNAC/C	1	289
DdeI	C/TNAG	7	215 273 317 431 665 915 989
EcoRII	/CCXGG	1	1371
HinfI	G/ANTC	6	180 220 385 862 1034 1311

Tab. 7b: Anzahl und Lokalisation der Restriktionsstellen. Angegeben ist die letzte Base im nicht-transkribierten Strang vor dem Schnitt. (N: beliebige Base; X: A oder T)

```
 0                                  10                                  20
ATG GTT CAT TTG GGT CCA AAA AAA CCA CAA GCT AGA AGA TTT ATG CAA GGA TTG ATG CAA CAA ATT GAG GAT TTC GAA AAA AAT TTC ACT
MET VAL HIS LEU GLY PRO LYS LYS PRO GLN ALA ARG ARG PHE MET GLN GLY LEU MET GLN GLN ILE GLU ASP PHE GLU LYS ASN PHE THR
                                   ALA ALA ALA     GAM ASX DEL SER LEU VAL  +  VAL HIS DEL EPS VAL  +  ILE

 30                                 40                                  50
GTT CCA ACT GAA ACT TTA CAA GCC GTT ACC AAG CAT TTC ATT TCC GAA TTG GAA AAG GGT TTG TCC AAG AAG GGT GGT AAC ATT CCA ATG
VAL PRO THR GLU THR LEU GLN ALA VAL THR LYS HIS PHE ILE SER GLU LEU GLU LYS GLY LEU SER LYS LYS GLY GLY ASN ILE PRO MET
 +   +  PRO DEL ILE  +   +   +   +  VAL SER ILE LEU THR THR ARG DEL ASX ASX GAM ASX  +       SER ALA ALA SER  +   +   +

 60                                 70                                  80
ATT CCA AGT TGG GTT AAT GGA CTT CCC AAA CTG GCT AAG GAC TCC GGT GAT TTC TTG GCC ATT GAT TTG GGT GGT ACC AAC TTG AGA GTT
ILE PRO SER TRP VAL ASN GLY LEU PRO LYS LEU ALA LYS ASP SER GLY ASP PHE LEU ALA ILE ASP LEU GLY GLY THR ASN LEU ARG VAL
VAL  +  GLY  +   +  LEU LYS GLX VAL SER GLY  +       GLX ALA  +  SER  +   +   +   +  VAL MET  +   +  GLY  +   +  GLX  +

 90                                100                                 110
GTC TTA GTC AAG TTG GGC GGT GAC CGT ACC TTT GAC ACC ACT CAA TCT AAG TAC AGA TTA CCA GAT GCT ATG AGA ACT ACT CAA AAT CCA
VAL LEU VAL LYS LEU GLY GLY ASP ARG THR PHE ASP THR THR GLN SER LYS TYR ARG LEU PRO ASP ALA MET ARG THR THR GLN ASN PRO
ILE  +  ILE SER  +  ALA  +  ARG GLX GLX SER SER ILE GAM ALA  +  ARG SER       +  ALA ALA  +   +  SER  +   +  ALA ILE  +

120                                130                                 140
GAC GAA TTG TGG GAA TTT ATT GCC GAC TCT TTG AAA GCT TTT ATT GAT GAC CAA TTC CCA CAA GGT ATC TCT GAG CCA ATT CCA TTG GGT
ASP GLU LEU TRP GLU PHE ILE ALA ASP SER LEU LYS ALA PHE ILE ASP GLU GLN PHE PRO GLN GLY ILE SER GLU PRO ILE PRO LEU GLY
SER ASX  +   +  GLY ASX EPS  +  DEL  +  ASX ALA  +   +  SER SER DEL  +   +       SER SER DEL ALA GLY SER VAL  +   +   +

150                                160                                 170
TTC ACC TTT TCT TTC CCA GCT TCT CAA AAC AAA ATC AAT GAA GGT ATC TTG CAA AGA TGG ACT AAA GGT TTT GAT ATT CCA AAC ATT GAA
PHE THR PHE SER PHE PRO ALA SER GLN ASN LYS ILE ASN GLU GLY ILE LEU GLN ARG TRP THR LYS GLY PHE ASP ILE PRO ASN ILE GLU
 +   +   +  GAM GLX ALA GLY ALA LYS GLX EPS VAL ILE LYS  +  GLX ILE THR GAM GLX ALA DEL ALA  +  SER LEU ALA GAM LEU DEL

180                                190                                 200
AAC CAC GAT GTT GTT CCA ATG TTG CAA AAG CAA ATC ACC AAG AGG AAT ATC CCA ATT GAA GTT GTT GCT TTG ATA AAC GAC ACT ACC GGT
ASN HIS ASP VAL VAL PRO MET LEU GLN LYS GLN ILE THR LYS ARG ASN ILE PRO ILE GLU VAL VAL ALA LEU ILE ASN ASP THR THR GLY
LYS LEU ILE SER ALA      +  DEL ASX ALA GAM PHE PRO ALA GLY  +       DEL EPS EPS SER  +   +  ASX  +  DEL  +  SER HIS  +

210                                220                                 230
ACT TTG GTT GCT TCT TAC TAC ACT GAC CCT GAA ACT AAG ATG GGT GTT ATC TTC GGT ACT GGT GTC AAT GGT GCT TAC TAC GAT GTT TGT
THR LEU VAL ALA SER TYR TYR THR ASP PRO GLU THR LYS MET GLY VAL ILE PHE GLY THR GLY VAL ASN GLY ALA TYR TYR ASP VAL CYS
ILE  +  GAM GAM VAL ASX  +   +   +  ALA DEL ILE  +   +   +  ILE  +   +   +  SER  +   +   +  ALA  +   +  TRP          +

240                                250                                 260
TCC GAT ATC GAA AAG CTA CAA GGA AAA CTA TCT GAT GAC ATT CCA CCA TCT GCT CCA ATG GCC ATC AAC TGT GAA TAC GGT TCC TTC GAT
SER ASP ILE GLU LYS LEU GLN GLY LYS LEU SER ASP ASP ILE PRO PRO SER ALA PRO MET ALA ILE ASN CYS GLU TYR GLY SER PHE ASP
ASX SER THR EPS ILE GLY ASX ALA ALA ASX GLY GLY DEL GAM GLY GLY ALA GLY GAM  +  EPS  +  CYS  +  ASX GLX SER  +   +  ARG

270                                280                                 290
AAT GAA CAT GTC GTT TTG CCA AGA ACT AAA TAC GAT ATC ACC ATT GAT GAA GAA TCT CCA AGA CCA GGC CAA CAA ACC TTT GAA AAA ATG
ASN GLU HIS VAL VAL LEU PRO ARG THR LYS TYR ASP ILE THR ILE ASP GLU GLU SER PRO ARG PRO GLY GLN GLN THR PHE GLU LYS MET
LYS ALA PHE PRO SER  +   +  GLX ILE GAM  +  LEU DEL  +  LEU  +  GAM EPS  +   +  GAM ALA      DEL LYS  +   +  EPS  +  ASX

300                                310                                 320
TCT TCT GGT TAC TAC TTA GGT GAA ATT TTG CGT TTG GCC TTG ATG GAC ATG TAC AAA CAA GGT TTC ATC TTC ATC AAG AAC CAA GAC TTG TCT
SER SER GLY TYR TYR LEU GLY GLU ILE LEU ARG LEU ALA LEU MET ASP MET TYR LYS GLN GLY PHE ILE PHE ILE LYS ASN GLN ASP LEU SER
 +  GAM ALA LYS ASX EPS  +   +  SER  +   +  ASX VAL  +   +  DEL PHE LYS DEL DEL  +  GLX DEL HIS DEL GAM EPS ALA EPS  +

330                                340                                 350
AAG TTC GAC AAG CCT TTC GTC ATG GAC ACT TCT TAC CCA GCC AGA ATC GAC GAA GAT CCA TTC GAG AAC CTA GAA GAT ACC GAT GAC TTG
LYS PHE ASP LYS PRO PHE VAL MET ASP THR SER TYR PRO ALA ARG ILE GLU GLU ASP PRO PHE GLU ASN LEU GLU ASP THR ASP ASP LEU
     +  GAM ALA ALA ASX  +  GLX  +   +   +   +   +  LYS  +   +  LYS LEU  +  HIS PHE  +   +  ARG EPS GAM EPS  +   +

360                                370                                 380
TTC CAA AAT GAG TTC GGT ATC AAC ACT ACT GTT CAA GAA CGT AAA TTG ATC AGA CGT TTA TCT GAA TTG ATT GGT GCT AGA GCT GCT AGA
PHE GLN ASN GLU PHE GLY ILE ASN THR THR VAL GLN GLU ARG LYS LEU ILE ARG ARG LEU SER GLU LEU ILE GLY ALA ARG ALA ALA ARG
 +  GAM GLY ASX GLX  +   +  ALA EPS LYS THR DEL MET LYS DEL VAL VAL  +   +  GAM LEU PHE  +   +  ALA  +  TYR  +  PHE  +

390                                400                                 410
TTG TCC GTT TGT GGT ATT GCT GCT ATC TGT CAA AAG AGA GGT TAC AAG ACC GGT CAC ATC GCT CCA GAC GGT TCC GTT TCA ACG AGA TAC
LEU SER VAL CYS GLY ILE ALA ALA ILE CYS GLN LYS ARG GLY TYR LYS THR GLY HIS ILE ALA ALA ASP GLY SER VAL SER THR ARG TYR
 +  VAL  +   +  GAM  +  DEL  +   +   +   +   +  LYS  +   +  SER SER  +   +   +   +   +  EPS  +   +  DEL ARG SER      +

420                                430                                 440
CCA GGT TTC AAA GAA AAG GCT GCC AAT GCT TTG AAG GAC ATT TAC GGC TGG ACT CAA CCT CAT CTA GAC GAC TAC CCA ATC AAG GTT GTT
PRO GLY PHE LYS GLU LYS ALA ALA ASN ALA LEU LYS ASP ILE TYR GLY TRP THR GLN PRO HIS LEU ASP ASP TYR PRO ILE LYS VAL VAL
SER  +   +  SER DEL ASX SER  +  THR GAM ASX DEL  +   +   +   +   +  PRO  +  SER ALA DEL DEL SER LYS  +   +  DEL ILE THR

450                                460                                 470
CCT GCT GAA GAT GGT TCC GGT CCT GGT GCC GCT GTT ATT GCT GCT TTG GCC CAA AAA AGA ATT GCT GAA GGT AAG TCC GTT GGT ATC ATC
PRO ALA GLU ASP GLY SER GLY PRO GLY ALA ALA VAL ILE ALA ALA LEU ALA GLN LYS ARG ILE ALA GLU GLY LYS SER VAL GLY ILE ILE
 +   +  ILE  +   +  DEL  +  ALA ALA SER GAM  +   +  GAM SER ILE  +  SER ALA EPS DEL SER GAM ALA DEL GAM SER ALA GAM

480
GGT GCT TAA ACT TAA TTT GTA AAT TAA GTT TGA
GLY ALA ochre  ochre          ochre  opal
GAM  +
```

Tab. 8: Gen- und Aminosäuresequenz der Hexokinase PII im Vergleich mit der von Anderson et al. (1978c) ermittelten Aminosäuresequenz. + zeigt übereinstimmende Aminosäuren an, eine Lücke fehlende Aminosäuren.

sich eine Teilsequenz für den Genstart konstruieren: A T G G T N C A Py Py T N G G N C C N A A Pu A A Pu C C N C A Pu G C N N G N. Pu bzw. Py bedeuten Purinbase bzw. Pyrimidinbase, bei N ist jede Base denkbar. Auf diese Weise ließ sich der Anfang des Gens eindeutig festlegen (Tab. 8).

Auf das Stop-Codon, das die Translation der Hexokinase beenden sollte, folgen noch 3 weitere Stop-Codone im gleichen Raster innerhalb der nächsten 24 Basen, außerdem noch ein Stop in einem der anderen Raster. Diese auffällige Häufung soll vermutlich ein Überlesen des Genendes verhindern.

Das gesamte HXK2-Gen hat mit dem Start- und dem ersten Stop-Codon eine Länge von 1449 Basen. Die Hexokinase PII besteht damit aus 481 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53 000 D; die SII-Form, der die N-terminalen 11 Aminosäuren der PII fehlen, aus 470 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 51 600 D. Aus der Aminosäuresequenz ergab sich die Aminosäureanalyse der Hexokinase (Tab. 9).

Durch die vier Cysteinreste können zwei intramolekulare Disulfidbrücken auftreten. Intermolekulare Brücken sind nicht zu erwarten, da zur Dissoziation in die Untereinheiten keine reduzierenden Bedingungen erforderlich sind. Von Schmidt und Colowick (1973a) lag eine Aminosäureanalyse der Hexokinase PII vor. Im Vergleich zur aus der DNA-Sequenz ermittelten Aminosäureanalyse gibt es für 10 Aminosäuren, darunter Asx als Summe von Asparagin und Asparaginsäure, identische Ergebnisse. Für Histidin, Phenylalanin, Prolin und Valin fehlten bei Schmidt und Colowick eine, bei Arginin, Isoleucin und Leucin zwei Aminosäuren, für Glx, die Summe von Glutamin und Glutaminsäure, hatten sie eine Aminosäure zuviel bestimmt. Da die Abweichungen meist bei häufigen Aminosäusäuren vorkommen, beträgt der Fehler nur bei Arginin und Histidin

Aminosäure	PII-Form	SII-Form	Aminosäureanalyse von Schmidt und Colowick (1973a)
Alanin	33	32	33
Arginin	20	19	18
Asparagin	19	19	
Asparaginsäure	34	34	
Asx	53	53	53
Cystein	4	4	4
Glutamin	23	22	
Glutaminsäure	30	30	
Glx	53	52	54
Glycin	40	39	40
Histidin	6	5	5
Isoleucin	38	38	36
Leucin	37	36	35
Lysin	34	32	34
Methionin	11	11	11
Phenylalanin	24	24	23
Prolin	30	28	29
Serin	25	25	25
Threonin	29	29	29
Tryptophan	4	4	4
Tyrosin	15	15	15
Valin	25	24	24
Summe	481	470	472

Tab. 9: Aus der Basensequenz abgeleitete Aminosäurezusammensetzung der Hexokinaseformen PII und SII im Vergleich zur Aminosäureanalyse von Schmidt und Colowick (1973a)
(Asx ist die Summe aus Asparagin und Asparaginsäure, Glx die Summe aus Glutamin und Glutaminsäure)

mehr als 3%. Auffallend war, daß Schmidt und Colowick (1973a) in ihrer Aminosäureanalyse insgesamt neun Aminosäuren zuwenig bestimmt haben. Das könnte daran liegen, das ihre Hexokinase PII einen beträchtlichen Anteil an der SII-Form enthielt. In diesem Fall wäre die Histidinanzahl richtig bestimmt, der Fehler beim Arginin betrüge nur noch eine Aminosäure.

Die von Schmidt und Colowick (1973b) bestimmten 11 aminoterminalen Aminosäuren konnten durch die DNA-Sequenzierung bestätigt werden, ebenso das von ihnen bestimmte C-terminale Alanin. Von Anderson et al. (1978c) wurde aus einer Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 0,21 nm die gesamte Aminosäuresequenz der Hexokinase bestimmt. Die verwendeten Kristalle waren aus Hexokinase PII hergestellt worden, die von Schmidt und Colowick zur Verfügung gestellt worden war. Aus der Röntgenstrukturanalyse ließen sich nicht alle Aminosäuren klar identifizieren, bei einigen wurde nur die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette abgeschätzt und als Gam (2 C-Atome), Del (3 C-Atome) und Eps (4 C-Atome in der Seitenkette) angegeben. Im Vergleich mit der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz stimmten 166 Aminosäuren überein, also über ein Drittel (Tab.8). Dabei wurden die Aminosäuren, bei denen nur die Kettenlänge richtig erkannt war, nicht berücksichtigt. Diese machten 28% der Aminosäuresequenz aus. Von den angegebenen Aminosäuren waren bei Anderson et al. also etwa die Hälfte richtig. In vielen Fällen war in der Röntgenstrukturanalyse die richtige funktionelle Gruppe erkannt, aber das Kohlenstoffgerüst falsch geschätzt worden, oder die Kohlenstoffkette war richtig, aber die funktionelle Gruppe war falsch bestimmt. Ordnet man die Sequenz aus der Röntgenstrukturanalyse nach der maximalen Übereinstimmung, so treten an mehreren Stellen Lücken auf. Es wurden also einzelne Aminosäuren übersehen. Außerdem fehlen die ersten 11 Aminosäuren; nach der Kristallisation lag offenbar die SII-Form vor.

In der Arbeit von Anderson et al. (1978c) werden die Sequenzen von zwei Nonapeptiden aus der Hexokinase PI erwähnt, die von Inagami und von Blair, Barnard und Hartley ermittelt wurden. Dabei stimmten 7 bzw. 8 Aminosäuren mit der entsprechenden Sequenz der PII überein (Abb. 18). Gegenüber der Hexokinase PI sind in dem mit Aminosäure 145 beginnenden Peptid Threonin und Leucin gegen Prolin und Isoleucin in den Positionen 145 und 146 ausgetauscht, in dem mit Aminosäure 390 beginnenden Fragment Valin gegen Isoleucin an Position 398. Dabei sind zweimal sehr ähnliche Aminosäuren ausgetauscht worden, nämlich eine aliphatische gegen eine andere aliphatische. Aus der DNA-Sequenz der Hexokinase PII ergibt sich, daß diese Unterschiede durch Veränderungen von nur einer Base möglich sind. Allerdings müßte dann in der Hexokinase PI Valin durch den etwas selteneren Code GTC und Threonin und Leucin durch die sehr selten verwandten Codone ACA bzw. CTT codiert werden. Die große Homologie dieser beiden Peptide bestätigt erneut, daß die beiden Hexokinase-Isoenzyme aus demselben Gen im Laufe der Evolution gebildet wurden.

Hexokinase PI	Thr	Leu	Pro	Leu	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
PII ab AS 145	Pro	Ile	+	+	+	+	+	+	+

Hexokinase PI	Leu	Ser	Val	Cys	Gly	Ile	Ala	Ala	Val
PII ab AS 390	+	+	+	+	+	+	+	+	Ile

Abb. 18: Vergleich zweier Peptide aus der Hexokinase PI mit den aus der DNA-Sequenz bestimmten homologen Fragmenten der Hexokinase PII. + bezeichnet übereinstimmende Aminosäuren.

3.11. Die selektive Benutzung des Triplettcodes im HXK2-Gen

Im genetischen Code stehen den 24 Aminosäuren 61 Triplettcodone zur Verfügung. Einige Aminosäuren lassen sich durch 2, 3, 4 oder 6 verschiedene Tripletts codieren. Nur für Methionin und Tryptophan ist der Code eindeutig festgelegt. Der genetische Code ist also redundant. Die Auswertung der Codone im HXK2-Gen zeigte, daß die verschiedenen Codone für eine Aminosäure nicht gleich häufig eingesetzt wurden. Bestimmte Codone waren bevorzugt, während andere nie oder selten benutzt wurden. Dasselbe galt auch für die drei Stop-Codone. Besonders drastisch war diese Bevorzugung eines Tripletts bei Cystein, Glutamin und Tyrosin, bei denen nur ein Code verwendet wurde, sowie bei Arginin, Glycin, Leucin, Prolin und Valin, bei denen ein Code stark bevorzugt war. Dagegen ließ sich keine derartige Selektivität für Asparagin, Asparaginsäure, Histidin und Lysin erkennen. Insgesamt wurden für das HXK2-Gen und seine Stopsequenz von den 64 Codonen 16 nie und 10 nur einmal benutzt (Tab. 10).

Diese Code-Selektivität könnte einer Regulation der Enzymsynthese dienen. Verschiedene tRNA's für dieselbe Aminosäure, aber mit verschiedenen Anticodonen kommen in der Zelle unterschiedlich häufig vor. Enthält eine mRNA viele Codone, deren entsprechende tRNA's selten sind, so wird dieser Messenger langsamer und damit seltener abgelesen als einer, der nur die häufigsten Codone benutzt. Proteine, die in der Zelle in hoher Konzentration vorkommen, sollten daher weniger "ungebräuchliche" Codone im Gen besitzen als seltene Proteine. Bennetzen und Hall (1982) konnten dies im Vergleich bereits sequenzierter Hefegene bestätigen. Für Hexokinase als eins der häufigsten Proteine der Zelle sollte die Selektivität des Codes besonders hoch sein. Tatsächlich benutzen die Gene für Iso-1-cytochrom C, Iso-2-cytochrom C und für Histone signifikant öfter seltene Codone. Auffällig war aber, daß das Triplett CTG für Arginin, das nach Bennetzen und Hall nie vewandt wurde, im HXK2-Gen viermal auftrat. Auch im Vergleich mit der

	2. Base A	2. Base G	2. Base C	2. Base T	3. Base
	14	15	-	1	A
1. Base	20	1	1	12	G
A	10	-	11	18	C
	9	1	17	19	T
	24	3	1	-	A
1. Base	6	-	-	-	G
G	17	3	9	5	C
	17	34	23	20	T
	22	-	24	4	A
1. Base	-	-	-	1	G
C	2	-	1	-	C
	4	4	5	1	T
	3	1	1	5	A
1. Base	-	4	-	26	G
T	15	-	9	17	C
	-	4	14	7	T

Tab. 10: Benutzung der Triplettcodone im HXK2-Gen (mit dem Start- und den vier im Raster liegenden Stop-Codonen)

Codeverwendung der Phosphoglycerat Kinase der Hefe (Hitzemann et al., 1981) zeigten sich einige Unterschiede. So ist der Code AAT in der Phosphoglycerat Kinase nur einmal verwendet, in der Hexokinase dagegen fast so oft wie AAC für Asparagin. Analog sind die Verhältnisse für die Lysin-Codone AAA und AAG und die Asparaginsäure-Codone GAA und GAG. Dafür werden im Phosphoglycerat Kinase-Gen die ungebräuchlichen Codone AGC und GGG verwendet, nicht aber für die Hexokinase (Tab. 11). Neben Aspekten der Regulation dürfte aber auch die Bindungsstabilität des DNA-Doppelstrangs bei der Wahl der Codone eine Rolle spielen. Zu lange Bereiche mit großer AT-Häufigkeit werden ebenso vermieden wie Bereiche mit großer GC-Häufigkeit. Dieser Aspekt könnte einen unterschiedlichen Gebrauch der Codone in verschieden häufig translatierten Proteinen erklären.

Codierte Aminosäure	Triplett	Häufigkeit im Gen der HXK	PFK	GI	GII	ADH	Codierte Aminosäure	Triplett	Häufigkeit der Ger HXK	PFK	GI	GII	AD
Alanin	GCA	1	1	-	-	-	Leucin	CTA	4	-	-	1	
	GCG	-	-	-	-	-		CTG	1	-	-	-	
	GCC	9	10	6	10	16		CTC	-	-	-	-	
	GCT	22	32	26	23	19		CTT	1	-	-	-	
Arginin	CGA	-	-	-	-	-		TTA	5	5	-	-	
	CGG	-	-	-	-	-		TTG	26	36	21	20	
	CGC	-	-	-	-	-	Lysin	AAA	14	2	1	2	
	CGT	4	1	-	-	-		AAG	20	40	25	24	
	AGA	15	10	11	11	8	Methionin	ATG	11	4	6	7	
	AGG	1	-	-	-	-	Phenylalanin	TTC	17	18	10	11	
Asparaginsäure	GAC	17	18	17	13	14		TTT	7	1	-	-	
	GAT	17	8	8	7	2	Prolin	CCA	24	17	12	10	
Asparagin	AAC	10	13	12	14	11		CCG	-	-	-	-	
	AAT	9	1	-	-	-		CCC	1	-	-	-	
Cystein	TCG	-	-	-	-	-		CCT	5	-	-	1	
	TCT	4	1	2	2	8	Serin	TCA	1	2	-	-	
Glycin	GGA	3	-	-	-	-		TCG	-	-	-	-	
	GGG	-	1	-	-	-		TCC	9	6	12	14	
	GGC	3	1	-	-	3		TCT	14	16	13	11	
	GGT	34	35	25	24	41		AGC	-	2	-	-	
Glutaminsäure	GAA	24	28	14	15	20		AGT	1	-	-	-	
	GAG	6	1	-	-	-	Threonin	ACA	-	-	-	-	
Glutamin	CAA	23	8	5	6	9		ACG	1	-	-	-	
	CAG	-	-	-	-	-		ACC	11	8	12	13	
Histidin	CAC	2	7	8	8	10		ACT	17	10	12	10	
	CAT	4	1	-	-	1	Tyrosin	TAC	15	7	10	10	1
Isoleucin	ATA	1	-	-	-	-		TAT	-	-	-	-	
	ATC	18	14	11	12	12	Tryptophan	TGG	4	2	3	3	
	ATT	19	9	9	7	9	Valin	GTA	-	-	-	-	
								GTG	-	-	-	-	
								GTC	5	22	15	12	1
								GTT	20	16	22	23	1

Tab. 11: Vergleich der Codonselektivität der Hexokinase PII (HXK) mit anderen Glycolyseenzymen (PFK: Phosphofructokinase, GI und GII: Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase I bzw. II, ADH: Alkohol Dehydrogenase I) Der bzw. die meistverwendeten Codone sind unterstrichen.

4. Diskussion

4. 1. Regulation der Glucose-Repression in Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae als fermentative Hefe bevorzugt die Hexosen Glucose und Fructose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Stehen diese Zucker im Kulturmedium zur Verfügung, so reprimiert die Hefe die Synthese der die Disaccharide Maltose und Saccharose verwertenden Enzyme Maltase und Invertase, der glucogenetischen Enzyme, der Atmungsenzyme sowie der Enzyme des Glyoxylatcyclus und des Tricarbonsäurecyclus. Dieser Effekt der Hexosen wird Glucose-Repression genannt. Es konnten verschiedene Mutanten mit einem Ausfall der Glucose-Repression isoliert und charakterisiert werden. Bei Mutationen der Gene HEX1, HEX2 und CAT80 war die Repression der Enzyme Invertase, Maltase und Malat Dehydrogenase ausgefallen (Entian und Zimmermann, 1980). Bei der CCR80-Mutante waren die Atmungsenzyme und die gluconeogenetischen Enzyme nicht mehr reprimierbar (Ciriacy, 1978). REG1-Mutanten führten zu einem Ausfall der Repression von Galaktokinase und Invertase (Matsumoto et al., 1983).

Auch die Derepression der reprimierbaren Enzyme unterliegt der Kontrolle durch eine Reihe von Genen. Mutationen im CAT1-Gen (Zimmermann et al., 1977) und im CAT3-Gen (Entian und Zimmermann, 1982) führten zu einem Derepressionsausfall der Enzyme des Glyoxylatcyclus und der Glucogenese sowie zu einer verlangsamten Derepression der Maltase nach Glucoseverbrauch. Vom CAT1-Gen konnte ein dominantes Mutantenallel CAT1-2^d isoliert werden, das eine beschleunigte Derepression verursacht. Der gleiche Effekt wurde durch die Mutation des epistatischen Gens CAT2 verursacht. Einen Derepressionsausfall wiesen auch die von Ciriacy (1977) isolierten Mutanten ccr2 und ccr3 auf. In SNF1-Mutanten ist die

Derepression der Invertase ausgefallen (Carlson et al., 1981). Außerdem konnten die SNF1-Mutanten nicht mit Glycerin als Kohlenstoffquelle wachsen. Vermutlich waren auch die Atmungsenzyme vom Derepressionsausfall betroffen.

Die große Zahl der an der Glucose-Repression und Derepression beteiligten Gene zeigt die Bedeutung dieses Regulationssystems für die Hefe. Die Komplexität des Regulationssystems erschwert aber auch die Aufklärung des Regulationsablaufs. Nach einer Hypothese von Magasanik (1961) sollte die Glucose-Repression durch Konzentrationsänderung eines oder mehrerer Glucosemetabolite ausgelöst werden. Bei der biochemischen Untersuchung der Repressionsmutanten konnte aber keine signifikante Konzentrationsänderungen des Metabolitspiegels festgestellt werden (Entian und Zimmermann, 1980). Dagegen stellte sich bei der Messung der Glycolyseenzyme heraus, daß in hex1-Mutanten die Hexokinaseaktivität um die Hälfte vermindert, in hex2-Mutanten aber um den Faktor 2 - 3 gegenüber Wildtyphefen erhöht war. In beiden Fällen war das Hexokinaseisoenzym PII betroffen. Durch Aktivitätsanfärbung elektrophoretisch aufgetrennter Mutantenrohextrakte konnte ein Hybrid aus defektem PII- und intaktem PI-Monomer in hex1-Mutanten nachgewiesen werden. Dies war ein eindeutiger Beweis, daß in hex1-Mutanten das Strukturgen der Hexokinase PII defekt war. Die Mutation war also allel zu der von Lobo und Maitra (1977a) isolierten hxk2-Mutation. In hex2-Mutanten war die Aktivität des Isoenzyms PII dagegen nur bei Glucoseanzucht erhöht, und das Enzym zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp. Hier war offensichtlich ein Regulationsgen betroffen, dessen Funktion sowohl die Hexokinase PII-Synthese als auch die Glucose-Repression kontrolliert. Eine zusätzliche Mutation im CAT80-Gen hob die gesteigerte Hexokinasesynthese auf. Dies zeigte, daß das CAT80-Genprodukt ebenfalls für die Regulation der PII-Synthese und die Glucose-Repression notwendig ist (Entian und Zimmermann, 1982).

Durch Enzymmessungen an verschiedenen Mutanten mit Defekten in der Hexosephosphorylierung ließ sich zeigen, daß nicht die in der Zelle vorhandene Phosphorylierungskapazität entscheidend für die Regulation der Glucose-Repression ist, sondern spezifisch die Anwesenheit des Isoenzyms PII (Entian, 1980a). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß die Hexokinase PII die Erkennungsstelle ("recognition site") der Glucose-Repression ist, die das Signal zur Glucose-Repression bei der Hexosephosphorylierung auslöst. Das setzt voraus, daß die Hexokinase ein bifunktionelles Enzym mit einer katalytischen und einer regulatorischen Funktion ist.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Arbeit mit einem speziellen Selektionssystem Mutanten isoliert, bei denen durch eine Mutation im Hexokinase PII-Strukturgen die Glucose-Repression ausgefallen war, deren Hexokinase PII aber noch katalytische Aktivität zeigte. Diese Mutanten wurden hex1^{r} genannt. Der Ausfall der Repression betraf dieselben Enzyme wie in den hex1-Mutanten. Die Existenz bewies, daß die Hexokinase PII tatsächlich zwei voneinander getrennte katalytische und regulatorische Domänen besitzt. Die enzymkinetischen Parameter der Hexokinase PII in den hex1^{r}-Mutanten waren mit denen von Hexokinase PII aus Wildtypzellen identisch (Opitz, 1984). Das katalytische Zentrum war also von der Mutation nicht beeinflußt.

Neben den Hexokinase-Isoenzymen PI und PII wurde ein Isoenzym PIII beschrieben (Kopetzki, 1982), bei dem es sich um eine Modifikation des Isoenzyms PII zu handeln scheint. Die PIII-Form macht in Wildtypzellen einen Anteil von 10% - 15% bezogen auf Isoenzym PII aus. Es ist möglich, daß die Umwandlung der PII- in die PIII-Form eine wichtige Rolle für die Auslösung der Glucose-Repression spielt. Bei den meisten hex1^{r}-Mutanten war der Anteil des Isoenzyms PIII an der gesamten Hexokinaseaktivität normal. Aber im Stamm D19.6#936 konnte kein Isoenzym PIII nachgewiesen werden (Opitz, 1984). Dies deutet darauf hin, daß die Hexokinase PIII bei der Regulation der Glucose-Repression eine Rolle spielen könnte.

Weitere Hinweise auf die Rolle der Hexokinase PII bei der Glucose-Repression konnten durch die Klonierung der Strukturgene der Hexokinasen PI und PII in Hefe gewonnen werden. Die Gene wurden auf Plasmiden in die Zelle eingeschleust und liegen dort mit etwa 50 Kopien pro Zelle vor. Dadurch ist die Hexokinaseaktivität in den Transformanten deutlich höher als in Wildtypzellen. Das klonierte HXK2-Gen führte in hex1-Mutanten zu einer Wiederherstellung der Glucose-Repression. Dagegen blieb die Repression in HXK1-Klonen ausgefallen. Das bewies endgültig, daß nicht die Phosphorylierungskapazität der Zelle zur Glucose-Repression entscheidend ist, sondern nur das Isoenzym PII.

Die HXK2-Klone enthielten das Isoenzym PIII in einem Anteil von 10 - 15% an der Hexokinase PII-Gesamtaktivität. Das beweist, daß Isoenzym PIII tatsächlich vom HXK2-Gen codiert wird und daß sie kein Isolierungsartefakt ist, sondern in vivo gebildet wird. Die hohe Hexokinase PIII-Aktivität in den Klonen erleichtert die Isolierung dieser Isoenzymform, wodurch zukünftig die weitere Charakterisierung des Isoenzyms und seines Unterschieds zur Hexokinase PII erleichtert wird.

Über den molekularen Mechanismus der Repressionsauslösung gibt es bisher nur Hypothesen. (i) Es wäre denkbar, daß die Hexokinase PII durch Glucose eine Konformationsänderung durchmacht und die entstehende Form direkt mit der DNA in Wechselwirkung tritt. Tatsächlich verursacht Glucose Konformationsänderungen des Enzyms und beeinflußt die Assoziation zum Dimer (Schulze und Colowick, 1969; Derechin et al., 1972; Shill et al., 1974). Auch bei der Glucosephosphorylierung kommt es zu Strukturveränderungen (Dela Fuente et al., 1970). Eine direkte Wechselwirkung der Hexokinase mit der Kern-DNA ist aber auszuschließen, da das Protein die Kernporen nicht passieren kann. (ii) Bei der glucosebedingten Konformationsänderung könnte aber ein Peptid abgespalten werden, das die Kernporen passieren kann und die regulatorische Funktion ausübt. Bei dieser Abspaltung könnte das Isoenzym PIII entstehen.

(iii) Möglich wäre auch die Wirkung über eine Nebenaktivität der Hexokinase PII, die durch Glucose aktiviert wird. Für das Isoenzym PI wurde die Phosphorylierung eines Serinrests im Enzym selbst beschrieben, die durch die Inkubation mit ATP und Xylose ausgelöst werden konnte (Cheng et al., 1973; Menezes und Pudles, 1976). Eventuell besitzt die Hexokinase PII eine spezifische Proteinkinaseaktivität und phosphoryliert in Gegenwart von Glucose, also im "induced fit"-Zustand, ein Regulatorpeptid. Die Nebenaktivität könnte auch in der Umwandlung eines niedermolekularen Stoffes zur eigentlichen Regulatorsubstanz bestehen. Ein derartiger Effekt ist für das lac-Operon von Escherichia coli bekannt, in dem die beta-Galaktosidase durch ihre Nebenaktivität Lactose zu Allolactose isomerisiert. Die Allolaktose als Induktor bewirkt unter anderem eine erhöhte beta-Galaktosidasesynthese.

4. 2. Gentechnologie in Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae bietet für das Klonieren von Eukaryontengenen große Vorteile gegenüber Escherichia coli, das bisher meist für gentechnologische Manipulationen benutzt wurde. Escherichia coli-Bakterien enthalten Toxine, die sich schwer vollständig entfernen lassen. Das erfordert aufwendige Reinigungsverfahren für die Isolierung von Proteinen, die zur klinischen Anwendung gedacht sind. Saccharomyces cerevisiae dagegen ist toxinfrei. Problematisch ist auch die Expression von Eukaryonten-Genen in Prokaryonten. Selbst wenn sie hinter einen starken Bakterienpromoter geschaltet sind, werden Fremdgene nur mit geringer Effizienz transkribiert. Zusätzlich werden die entstehenden Proteine oft schnell abgebaut. In der eukaryontischen Hefe ist eine effektivere Fremdgenexpression zu erwarten.

Zur Klonierung in Hefe wurde eine Reihe von hybriden Plasmiden konstruiert, die in der Hefezelle in unterschiedlich hoher Stückzahl vorliegen. YIp- und YCp-Plasmide sind zwar in der Hefe relativ stabil, liegen aber nur mit einem Exemplar pro Zelle vor. Die zu hoher Kopienzahl vermehrten YRp- und YEp-Plasmide werden dage-

gen ohne Selektionsdruck schnell verloren. Diese Plasmide ermöglichen aber eine hohe Syntheserate für die codierten Proteine. Auch zu einer Produktionssteigerung hefeeigener Proteine sind diese Plasmide daher interessant. Durch Klonieren des HXK2-Gens konnte die Hexokinase PII-Aktivität um den Faktor 50 gegenüber Wildtypstämmen erhöht werden. Dabei machte die Hexokinase bis zu 10% des Gesamtproteins aus. Offensichtlich besitzt das HXK2-Gen einen sehr effizienten Promoter. Das könnte zur Expression dahintergeschalteter Fremdgene ausgenutzt werden. Einen weiteren Vorteil bedeutet dabei die Möglichkeit der Synthesekontrolle durch die Gene hex2 und cat80.

4. 3. Die Basensequenz des HXK2-Gens

Das in der vorliegenden Arbeit isolierte Hexokinase PII-Gen wurde sequenziert und die sich ergebende Aminosäuresequenz mit den bisher vorliegenden Daten verglichen. Schmidt und Colowick (1973a) bestimmten das Molekulargewicht der Hexokinase mit verschiedenen Methoden und gaben es mit "leicht über 50 000 D" an. Aus der Sequenzierung wurde für die Hexokinase PII eine Anzahl von 481 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53 000 D errechnet, für die SII-Form 470 Aminosäuren mit 51 600 D. Die Aminosäurezusammensetzung der Hexokinase PII wurde von Schmidt und Colowick (1973a) bestimmt. Eine angenäherte Aminosäuresequenz wurde von Anderson et al. (1978c) aus einer Röntgenstrukturanalyse ermittelt. Eine Fehlerquelle bei diesen Arbeiten beruht darauf, daß die Hexokinase PII sehr stark von Proteasen angegriffen wird. Schon extrem geringe Mengen von Trypsin spalten von den aminoterminalen Enden der Hexokinasemonomere 11 Aminosäuren ab. Bei der elektrophoretischen Auftrennung gereinigter Hexokinase PII unter denaturierenden Bedingungen zeigt das Enzym eine Reihe von Proteinbanden. Es ist partiell proteolysiert. Dadurch enthält jede Präparation auch proteolytische Abbauprodukte, was zu Fehlern bei der Aminosäureanalyse führen kann. Die aus der DNA-Sequenz ermittelte Aminosäuresequenz und -zusammensetzung unterliegt dieser

Einschränkung nicht. Es zeigte sich, daß die von Schmidt und Colowick analysierte Hexokinase vermutlich einen beträchtlichen Anteil der SII-Form enthielt, da insgesamt 9 Aminosäuren zuwenig bestimmt wurden. Auch die Sequenz von Anderson et al. (1978c) entspricht eher der SII-Form, da die aminoterminalen Aminosäuren nicht detektiert wurden. Immerhin zeigte sich, daß bei der Röntgenstrukturanalyse etwa ein Drittel der Aminosäuren richtig erkannt wurde. Die Sequenz des von Schmidt und Colowick (1973b) bestimmten aminoterminalen Endes aus 11 Aminosäuren konnte durch die DNA-Sequenz voll bestätigt werden.

Von der Hexokinase PI liegt noch keine vollständige Aminosäuresequenz vor. Von Inagami und von Blair, Barnard und Hartley wurde aber jeweils ein Fragment von 9 Aminosäuren aus der Hexokinase PI sequenziert. Die Sequenzen stimmten bis auf ein bzw. zwei Aminosäuren mit den homologen Bereichen der Hexokinase PII überein. Dabei waren zweimal ähnliche Aminosäuren ausgetauscht, wie aus der DNA-Sequenzierung ermittelt wurde. Das zeigt erneut die enge Verwandtschaft der beiden Isoenzyme.

4. 4. Codonselektivität der Hexokinase

Die Analyse der Sequenzen von Genen aus Hefe und Escherichia coli zeigte, daß von den 64 Triplettcodonen, die den 24 Aminosäuren zur Verfügung stehen, nur ein Teil genutzt wird (Post et al., 1979). Dabei bevorzugt Escherichia coli nicht immer die gleichen Tripletts wie Saccharomyces cerevisiae. Auch das Hexokinasegen weist eine große Codeselektivität auf. Von den 61 Triplettcodonen, die den 24 Aminosäuren zur Verfügung stehen, werden 16 nicht und 10 nur einmal genutzt. Bei den häufig benutzten werden bestimmte Basenfolgen vermieden. So sind alle Codone selten, die nur eine Base verwenden, ebenso die, welche nur A und T oder G

und C verwenden. GC-Paare weisen eine besonders feste Bindung auf, AT-Paare eine besonders schwache. Für die Paarung zwischen mRNA und tRNA werden offensichtlich alle Kombinationen gemieden, die eine außergewöhnlich feste oder eine außergewöhnlich lockere Bindung aufweisen. Diese Codonselektivität tritt in allen bisher sequenzierten Hefegenen auf, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Dabei ist die Verwendung der häufigen Tripletts streng korreliert mit dem Anteil der mRNA des entsprechenden Gens an der gesamten mRNA der Zelle (Bennetzen und Hall, 1981). So werden bei den Enzymen Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase, Enolase und Alkoholdehydrogenase (ADH-I), die jeweils einen Anteil von mehr als 1% der gesamten mRNA ausmachen, mehr als 96% der Aminosäuren von 25 Tripletts codiert. 28 Codone werden von diesen Genen nicht verwendet. Bei den Cytochrom C-Isoenzymen, die weniger als 0,1% der mRNA ausmachen, werden nur etwa 10 Codone nicht benutzt. Vermutlich dient die Selektivität einer übergeordneten Syntheseregulation auf der Translationsebene. Die häufigen Codone sind zu den in der Zelle am häufigsten vorkommenden Anticodonen der tRNA's homolog. MessengerRNA's, die viele seltene Codone enthalten, ten, werden deshalb langsamer und damit seltener translatiert.

Obwohl die Hexokinase PII auch zu den Hauptenzymen der Hefezelle gehört, zeigt sie eine deutlich geringere Codonselektivität als Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase, ADH-I und die Enolaseisoenzyme. So machen die häufigsten 25 Codone nur einen Anteil von knapp 90% an der Gesamtsequenz aus. Die Hexokinase benutzt mehrere Tripletts, die in den anderen häufigen Enzymen nie vorkommen, TTT für Phenylalanin sogar 7mal und AAT für Asparagin 9mal. Der AAT-Code wird sogar fast so oft wie der sonst einzige Asparagin-Code AAC benutzt. Bei Asparaginsäure und Lysin überwiegt der häufigste Code viel weniger deutlich als bei den anderen Enzymen. Es werden sogar Tripletts benutzt, die selbst für die wenig synthetisierten Histone und Cytochrome nicht verwendet

werden, wie CCC für Prolin, CUG für Leucin und CGT für Arginin sogar 4mal. Allerdings kommt CGT auch in der 3-Phosphoglycerat Kinase 3mal vor (Hitzeman et al., 1982). Dies außergewöhnliche Verhalten könnte mit der Entstehung der Hexokinase PII durch Genduplikation und dem Erwerb seiner regulatorischen Funktion zu tun haben. Eventuell wurde die Ausbildung der regulatorischen Domäne am schnellsten durch Mutationen erreicht, die zu seltenen Tripletts führten. Der dadurch entstehende Nachteil der Zelle wäre dann durch die Möglichkeit ausgeglichen, den Kohlenhydratstoffwechsel wirksam steuern zu können. Das könnte auch erklären, warum die Hexokinase PII nur 20% der Hexokinase PI an Zellprotein ausmacht. Möglicherweise ist dies eine Folge der Benutzung seltener Tripletts. Die Basensequenz des HXK1-Gens könnte dazu weitere Hinweise ergeben. Sie sollte nämlich nicht diese auffällige Benutzung seltener Basen zeigen, dafür aber an den homologen Regionen Tripletts, die durch ein einziges Mutationsereignis den entsprechenden seltenen Code geben.

5. Zusammenfassung

Isolierung regulatorischer Mutanten, Klonierung und Sequenzierung des Hexokinase PII-Gens

Die Hefe Saccharomyces cerevisiae ist in der Lage, ihren Stoffwechsel gezielt auf die Vergärung von Hexosen einzustellen. Dazu wird die Synthese einer Vielzahl von Enzymen reprimiert, sog. Glucose-Repression. Eine zentrale Bedeutung kommt hier dem Hexokinaseisoenzym PII zu. Durch ein geeignetes Selektionssystem wurden Hefen mit Mutationen im Strukturgen der Hexokinase PII isoliert, bei denen die Glucose-Repression ausgefallen war, die aber weiterhin katalytisch aktiv waren. Diese hexl^{r}-Mutanten bestätigen die Hypothese, daß die Hexokinase PII ein bifunktionelles Enzym ist, das neben dem katalytischen Zentrum eine regulatorische Domäne besitzt, die für die Auslösung der Glucose-Repression verantwortlich ist.

Zur Erfassung des molekularen Bereichs der Auslösereaktion wurden das Hexokinase PI- und das Hexokinase PII-Gen kloniert. Die Glucose-Repression konnte in einem Stamm, dem beide Hexokinase-Isoenzyme fehlten, durch Transformation mit dem PII-Gen wieder hergestellt werden, während sie in PI-Transformanten weiter ausgefallen blieb.

Aus den PII-Transformanten konnten 2 Plasmidtypen isoliert werden, YRp/HXK2-1 mit einem Insert von 5 kBp Länge und YRp/HXK2-2 mit einem Insert von 7 kBp Länge. Die Inserts überlappten sich um 3,5 kBp. Durch Subklonierung konnten Plasmide mit Insertlängen zwischen 2,4 und 4,1 kBp isoliert werden. Das Gen konnte in einem Bereich von 1,65 kBp lokalisiert werden. Das HXK2-Gen wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert sequenziert. Es hat eine Länge

von 1449 Basenpaaren vom Start- bis zum ersten Stopcodon. Die Hexokinase PII besteht damit aus 481 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53 000 D, die SII-Form aus 470 Aminosäuren mit 51 600 D.

Das HXK2-Gen weist eine geringere Codon-Selektivität auf als die Gene anderer Glycolyseenzyme und benutzt Basen-Tripletts, die in anderen vergleichbaren Hefegenen nicht vorkommen. Die Bedeutung dieses Phänomens für die Syntheseregulation wird diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

Ainslie, G.R.Jr.; Shill, J.P.; Neet, K.E.: Transients and cooperativity. A slow transition model for relating transients and cooperative kinetics in enzymes. J. Biol. Chem. 247, 7088 - 7096 (1972).

Anderson, C.M.; McDonald, R.C.; Steitz, T.A.: Sequencing a protein by X-ray crystallography. I. Interpretation of yeast hexokinase B at 2.5 Å resolution by model building. J. Mol. Biol. 123, 1-13 (1978a).

Anderson, C.M.; Stenkamp, R.E.; McDonald, R.C.; Steitz, T.A.: A refined model of the sugar binding site of yeast hexokinase B. J. Mol. Biol. 123, 207-219 (1978b).

Anderson, C.M.; Stenkamp, R.E.; Steitz, T.A.: Sequencing a protein by X-ray crystallography. II. Refinement of yeast hexokinase B co-ordinates and sequence at 2.1 Å resolution. J. Mol. Biol. 123, 15-33 (1978c).

Beggs, J.D.: Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275, 104-109 (1978).

Bennett, W.S.; Steitz, T.A.: Structure of a complex between yeast hexokinase A and Glucose. I. Structure determination and refinement at 3.5 A resolution. J. Mol. Biol. 140, 183-210 (1980).

Bennett, W.S.; Steitz, T.A.: Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. II. Detailed comparison of conformation and active site configuration with the native hexokinase B monomer and dimer. J. Mol. Biol. 140, 211-230 (1980).

Bennetzen, J.L. und Hall, B.D.: Codon selection in yeast. J. Biol. Chem. 257, 3026-3031 (1982).

Biely, P.; Bauer, S.: The formation of uridine diphosphate-2-deoxy-D-glucose in yeast. Biochim. Biophys. Acta 121, 213-214 (1966).

Biely, P.; Bauer, S.: The formation of guanosin diphosphate-2-deoxy-D-glucose in yeast. Biochim. Biophys. Acta 156, 432-434 (1968).

Biely, P.; Krátky, Z.; Bauer, S.: Metabolism of 2-deoxy-D-glucose by bakers yeast. IV. Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into cell wall mannan. Biochim. Biophys. Acta 255, 631-639 (1972).

Botstein, D.; Davis, R.W.: Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces Metabolism and Gene Expression; Cold Spring Harbor monograph series 11B, 607-636 (1982)

Carlson, M.; Osmond, B.C.; Botstein, D.: Mutants of yeast defective in sucrose utilization. Genetics 98, 25-40 (1981).

Chambers, D.A.; Zubay, G.: The stimulatroy effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on DNA-directed synthesis of ß-galactosidase in a cell-free system. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 118- 122 (1969).

Cheng, L.Y.; Inagami, T.; Colowick, S.P.: Abstract in Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 667 (1973).

Ciriacy, M.: Genetics of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae. I. Isolation and genetic analysis of mutants. Mut. Res. 29, 315-326 (1975).

Ciriacy, M.: Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite repression. Mol. Gen. Genet. 154, 213-220 (1977).

Ciriacy, M.: A yeast mutant with glucose-resistant formation of mitochondrial enzymes. Mol. Gen. Genet. 129, 329-335 (1978).

Clewell, D.B.; Helinski, D.R.: Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: Purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 1159-1166 (1970).

Colowick, S.P.: The hexokinases. In: Meth. Enzym. (P.D. Boyer, ed.) IX, pp 1-48 (1973).

Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Hsu, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114 (1972).

Danner, D.B.; Deich, R.A.; Sisco, K.L.; Smith, H.O.: An eleven-base-pair sequence determines the specifity of DNA uptake in Haemophilus transformation. Gene 11, 311-318 (1980).

Davis, B.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427 (1964).

Derechin, M.; Ramel, A.H.; Lazarus, N.R.; Barnard, E.A.: Yeast hexokinase II: Molecular weight and dissociation behavior. Biochem. 5, 4017-4025 (1966).

Derechin, M.; Rustum, X.M.; Barnard, E.A.: Dissociation of yeast hexokinase under the influence of substrates. Biochem. 11, 1793-1797 (1972).

Dickson, R.C.; Abelson, J.; Barnes, W.N.; Reznikoff, W.S.: Genetic regulation: the lac control region. Science 187, 27-35 (1975).

Dixon, G.H.; Kornberg, H.L.: Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. Biochem J. 72, 3P (1959).

Duncan, H.M.; Mackler, B. J.: Electron transport systems of yeast. J. Biol. Chem. 241, 1694-1697 (1966).

Duntze, W.; Neumann, D.; Holzer, H.: Glucose induced inactivation of malate-dehydrogenase in intact yeast cells. Eur. J. Biochem. 3, 326-331 (1968).

Duntze, W.; Neumann, D.; Gancedo, J.M.; Atzpodien, W.; Holzer, H.: Studies on the regulation and localisation of the glyoxylate cycle enzymes in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 10, 83-89 (1969).

Entian, K.-D.: Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. Mol. Gen. Genet. 178, 633-637 (1980a).

Entian, K.-D.: A defect in carbon catabolite repression associated with uncontrollable and excessive maltose uptake. Mol. Gen. Genet. 179, 169-175 (1980b).

Entian, K.-D.: A carbon catabolite repression mutant of Saccharomyces cerevisiae with elevated hexokinase activity: Evidence for a regulatory control of hexokinase PII synthesis. Mol. Gen. Genet. 186, 278-282 (1981).

Entian, K.-D.; Dröll, L.; Mecke, D.: Studies on rapid reversible and non-reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase in wild-type and glycolytic block mutants of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 134, 187-192 (1983).

Entian, K.-D.; Fröhlich, K.-U.: Saccharomyces cerevisiae mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. J. Bact. 158, 29-35 (1984).

Entian, K.-D.; Fröhlich, K.-U.; Mecke, D.: Regulation of enzymes and isoenzymes of carbohydrate metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 799, 181-186 (1984).

Entian, K.-D.; Mecke, D.: Genetic evidence for a role of hexokinase isoenzyme PII in carbon catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 257, 870-874 (1982).

Entian, K.-D.; Zimmermann, F.K.: Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 177, 345-350 (1980).

Entian, K.-D.; Zimmermann, F.K.: New genes involved in carbon catabolite repression and derepression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Bact. 151, 1123-1128 (1982).

Entian, K.-D.; Zimmermann, F.K.; Scheel, I.: A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of Saccharomyces cerevisiae with reduced hexose phosphorylation. Mol. Gen. Genet. 156, 99-105 (1977).

Farkas, V.; Bauer, S.; Zemek, J.: Metabolism of 2-deoxy-D-glucose in bakers yeast. III. Formation of 2,2'-dideoxy-alpha, alpha-trehalose. Biochim. Biophys. Acta 184, 77-84 (1969).

Ferguson, J.J.; Boll, M.; Holzer, H.: Yeast malate dehydrogenase: enzyme inactivation on catabolite repression. Eur. J. Biochem. 1, 21-25 (1967).

Fowell, R.: Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. Nature 170, 578 (1952).

Friedmann, T.; Brown, D.B.: Base-specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue-sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine. Nucl. Acids Res. 5, 615-622 (1978).

Fröhlich, K.-U.; Entian, K.-D.: Regulation of gluconeogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae: evidence for a conversion of enolase isoenzymes. FEBS Lett. 139, 164-166 (1982).

Fröhlich, K.-U.; Entian, K.-D.; Mecke, D.: Cloning and restriction analysis of the hexokinase PII gene of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 194, 144-148 (1984).

Dela Fuente, G.; Lagunas, R.; Sols, A.: Induced fit in yeast hexokinase. Eur. J. Biochem. 16, 226-233 (1970).

Funayama, S.: Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. Eur. J. Biochem. 109, 61-66 (1980).

Gancedo, C.: Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. J. Bact. 107, 401-405 (1971).

Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non fermenting yeast. Arch. Microbiol. 76, 132-138 (1971).

Gancedo, C.; Salas, M.L., Giner, A.; Sols, A.: Reciprocal effects of carbon sources on the level of an cAMP-sensitive fructose-1,6-diphosphatase and phosphofructokinase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 15-20 (1965).

Gancedo, C.; Schwerzman, N.: Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 109, 221-225 (1976).

Gancedo, C.; Schwerzman, N.; Molano, J.: Regulation of fructose-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase from Saccharomyces cerevisiae: facts and problems. Proc. fourth Int. Symp. Yeasts, A5, p 9 (1974).

Gascón, S.; Neumann, N.P.; Lampen, J.O.: Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. J. Biol. Chem. 243, 1573-1577 (1968).

Glynn, I.M.; Chappell, J.B.: A simple method for the preparation of ^{32}P-labelled adenosine triphosphate of high specific activity. Biochem. J. 90, 147-149 (1964).

Haarasilta, S.; Oura, E.: On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenetic enzymes during the growth process of bakers yeast. The biphasic growth. Eur. J. Biochem. 52, 1-7 (1975).

Hägele, E.; Neeff, J.; Mecke, D.: The malate dehydrogenase isoenzymes of Saccharomyces cerevisiae. Purification, characterization and studies on their regulation. Eur. J. Biochem. 83, 67-76 (1978).

Halverson, H.O.; Ellias, L.: Purification and properties of an alpha-glucosidase of Saccharomyces italicus Y 1225. Biochim. Biophys. Acta 30, 28-40 (1958).

Heredia, C.F.; Dela Fuente, G.; Sols, A.: Metabolic studies with 2-deoxyhexoses. I. Mechanism of inhibition of growth and fermentation on bakers yeast. Biochim. Biophys. Acta 96, 216-223. (1964).

Hitzeman, R.A.; Hagie, F.E.; Hayflick, J.S.; Chen, C.Y.; Seeburg, P.H.; Derynch, R.: The primary structure of the Saccharomyces cerevisiae gene for 3-phosphoglycerate kinase. Nucl. Acid. Res. 10, 7791-7808 (1982).

Holmes, D.S.; Quigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, 193-197 (1981).

Holzer, H.; Holzer, E.; Schultz, G.: Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung. Biochem. Z. 326, 385-404 (1955).

Johnson, B.F.: Lysis of yeast cell walls induced by 2-deoxyglucose at their sites of glucan synthesis. J. Bact. 95, 1169-1172 (1968).

Kochetkov, N.K.; Budovskii, E.I.: Organic chemistry of nucleic acids, part B. Plenum, New York, 401-423 (1972).

Kopetzki, E.: Untersuchung der Hexokinaseisoenzyme und deren Funktion bei der Regulation der Kohlenstoffkatabolitrepression in der Hefe Saccharomyces cerevisiae. Diplomarbeit, U Tübingen (1982).

Kopetzki, E.; Entian, K.-D.: Purification of yeast hexokinase isoezymes using affinity chromatography and chromatofocusing. Anal. Biochem. 121, 181-185 (1982).

Kosow, D.P.; Rose, J.A.: Product inhibition of the hexokinases. J. Biol. Chem. 245, 198-204 (1970).

Kosow, D.P.; Rose, J.A.: Activators of yeast hexokinase. J. Biol. Chem. 246, 2618-2625 (1971).

Kuo, S.-C.; Lampen, J.O.: Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of synthesis of glucoprotein enzymes by protoplasts of Saccharomyces: Relation to inhibition of sugar uptake and metabolism. J. Bact. 111, 419-429 (1972).

Lagunas, R.: Energetic irrelevance of aerobiosis for Saccharomyces cerevisiae growing on sugars. Mol. Gen. Genet. 27, 139-146 (1979).

Lagunas, R.: Is Saccharomyces cerevisiae a typical facultative anaerobe? TIBS 6, 201-203 (1981).

Lagunas, R.; Domínguez, C.; Busturia, A.: Sáez, M.J.: Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in Saccharomyces cerevisiae: Inactivation of sugar transport systems. J. Bact. 152, 19-25 (1982).

Lagunas, R.; Gancedo, C.: Role of phosphate in the regulation of the Pasteur effect in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 137, 479-483 (1983).

Lawley, P.D.: Effects of some chemical mutagens and carcinogens on nucleic acids. Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol. 5, 89-131 (1966).

Lawley, P.D.; Brookes, P.: Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. Biochem. J. 89, 127-138 (1963).

Lawley, P.D.; Thatcher, C.J.: Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine. Biochem. J. 116, 693-707 (1970).

Lederer, B.; Vissens, S.; van Schaftingen, E.; Hers, H.G.: Fructose-2,6-bisphosphate in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 1281-1287 (1981).

Lenz, A.-G.; Holzer, H.: Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in Saccharomyces cerevisiae by glucose. FEBS Lett. 109, 271-274 (1980).

Lobo, Z.; Maitra, P.K.: Resistance to 2-deoxyglucose in yeast: A direct selection of mutants lacking glucose-phosphorylating enzymes. Mol. Gen. Genet. 157, 297-300 (1977a).

Lobo, Z.; Maitra, P.K.: Genetics of yeast hexokinase. Genetics 86, 727-744 (1977b).

Loomis, W.F.; Magasanik, B.: Genetic control of catabolite repression of the lac operon in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 230-234 (1965).

Lynen, F.; Hartmann, G., Netter, K.F.; Schnegraf, A.: Phosphate turn over and pasteur effect. In: Regulation of Cell Metabolism. (G.E.W. Wolstenholme und C.M. O'Connor, eds.) pp 256-276 Churchill, London (1959).

Magasanik, B.: Catabolite repression. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 249-256 (1961).

Mahler, H.R.; Lin, C.C.: Exogenous adenosine 3' :5'-monophosphate can release yeast from catabolite repression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1039-1047 (1978).

Maitra, P.K.: A glucokinase from Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 245, 2423-2431 (1970).

Maitra, P.K.; Lobo, Z.: Control of glycolytic enzyme synthesis in yeast by products of the hexokinase reaction. J. Biol. Chem. 246, 489-499 (1971).

Maitra, P.K.; Lobo, Z.: Genetics of yeast glucokinase. Genetics 105, 501-515 (1983).

Makman, R.S.; Sutherland, E.W.: Adenosine 3',5'-phosphate in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 240, 1309-1314 (1965).

Matsumoto, K.U.J.; Soshima, Y.; Ishikawa, T.: Isolation and characterisation of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 2355-2359 (1982a).

Matsumoto, K.; Uno, J.; Toh-é, A.; Ishikawa, T.; Oshima, Y.: Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae: Evidence from mutants capable of utilizing it as an adenine source. J. Bact. 150, 277-285 (1982b)

Matsumoto, K.; Uno, J.; Tatsudo, I.; Ishikawa, T.; Oshima, Y.: Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae: Evidence from mutants unable to synthesize it. J. Bact. 156, 898-900 (1983).

Maxam, A.M.; Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977).

Maxam, A.M.; Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. In: Meth. Enzym. (L. Grossmann und K. Moldave, eds.) 65, 499-560 (1980).

Mazón, M.J.; Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Inactivation and turnover of fructose-1,6-bisphosphatase from Saccharomyces cerevisiae. In: Metabolic interconvertions of enzymes (H. Holzer, ed.) pp 168-173, Springer Verlag Berlin (1980).

Mazón, M.J.; Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Inactiation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. In vivo phosphorylation of the enzyme. J. Biol. Chem. 257, 1128-1130 (1982a).

Mazón, M.J.; Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-bisphosphatase in vivo by glucose and by proton ionophores. A possible role for cAMP. Eur. J. Biochem. 127, 605-608 (1982b).

Menezes, L.C.; Pudles, J.: Studies on the active site of yeast hexokinase. Specific phosphorylation of a serine residue induced by D-xylose and ATPMg. Eur. J. Biochem. 65, 41-47 (1976).

Meyerhof, O.: Über den Einfluß des Sauerstoffs auf die alkoholische Gärung der Hefe. Biochem. Z. 162, 43-86 (1925).

Montenecourt, B.C.; Kuo, S.; Lampen, J.O.: Saccharomyces mutants with invertase formation resistant to repression by hexoses. J. Bact. 114, 233-238 (1973).

Moreno, F.; Ochoa, A.G.; Gascon, S.; Villanueve, J.R.: Molecular forms of invertase. Eur. J. Biochem. 50, 571-579 (1975).

Mortimer, R.K.; Hawthorne, D.C.: Yeast genetics. In: The Yeasts. (A.H. Rose und J.S. Harrison, eds.) I, pp 385-460 (1969).

Mortimer, R.K.; Schild, D.: Genetic map of Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Rev. 44, 519-571 (1980).

Müller, D.; Holzer, H.: Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 926-933 (1981).

Müller, M.; Müller, H.; Holzer, H.: Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 256, 723-727 (1981).

Nasmyth, K.A.; Reed, S.J.: Isolation of genes by complementation in yeast. Molecular cloning of a cell-cycle gene. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2119-2123 (1980).

Neeff, J.; Hägele, E.; Nauhaus, J.; Heer, U.; Mecke, D.: Application of an immunoassay to the study of yeast malate dehydrogenase inactivation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 276-282 (1978).

Ohmori, H.; Tomizawa,J.; Maxam, A.M.: Detection of 5-methylcytosine in DNA sequences. Nucl. Acids Res. 5, 1479-1485 (1978).

Opitz, H.: Untersuchung der regulatorischen Funktion der Hexokinase Isoenzyme PII und PIII bei der Kohlenstoffkatabolitrepression in der Hefe Saccharomyces cerevisiae. Diplomarbeit, U Tübingen (1984).

Ornstein, L.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964).

Pastan, I.; Perlman, R.: The role of the lac promotor locus in the regulation of ß-galactosidase synthesis by cyclic 3'-5'adenosine monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci.USA 61, 1336-1342 (1968).

Pastan, I.; Perlman, R.L.: Repression of ß-galactosidase synthesis by glucose in phosphotransferase mutants of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 244, 5836-5842 (1969).

Pasteur, L.: Etudes sur la Bière. Gauthier-Villars, Paris (1876).

Perlman, R.L.; De Crombrugghe, B.; Pastan. I.: Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in Escherichia coli. Nature 221, 810-812 (1969).

Perlman, R.; Pastan, I.: Cyclic 3',5'AMP: Stimulation of ß-galactosidase and tryptophanase induction in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 656-664 (1968b)

Polakis, E.S.; Bartley, W.: Changes in enzyme activities in Saccharomyces cerevisiae during aerobic growth on different carbon sources. Biochem. J. 97, 284-297 (1965).

Polakis, E.S.; Bartley, W.; Meek, G.A.: Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth on yeast on different carbon sources. Biochem. J. 97, 298-302 (1965).

Post, L.E.; Strycharz, G.D.; Nomura, M.; Lewis, H.; Dennis, P.P.: Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for the RNA polymerase subunit ß in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1697-1701 (1979).

Pribnow, D.: Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promotor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 784-788 (1975).

Ramel, A.; Barnard, E.A.; Schachman, H.K.: Macromolecular organisation and the active center of yeast hexokinase. Angew. Chemie, Int. Ed. 2, 745-746 (1963).

Ramel, A.H.; Rustum, X.M.; Jones, J.G.; Barnard, E.A. Yeast hexokinase IV: Multiple forms of hexokinase in the yeast cell. Biochem. 10, 3499-3508 (1971).

Rigby, P.W.J.; Dieckmann, M.; Rhodes, C.: Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977).

Salas, M.L.; Vinuela, E.; Salas, M.; Sols, A.: Citrate inhibition of phosphofructokinase and the Pasteur effect. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 371-376 (1965).

Schachman, H.K.: Deductions from hydrodynamic and thermodynamic measurements. Brookhaven Symp. Biol. 13, 49-70 (1960).

Schaller, H.; Gray, C.; Hermann, K.: Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 737-741 (1975).

Schamhart, D.H.J.; ten Berge, A.M.A.; van de Poll, K.W.. A spontaneous catabolite repression insensitive mutant in Saccharomyces. J. Bact. 121, 747-760 (1975).

Schlanderer, G.; Dellweg, H.: Cyclic AMP and catabolite repression in yeasts. Eur. J. Biochem. 49, 305-316 (1974).

Schmidt, J.J.; Colowick, S.P.: Chemistry and subunit structure of yeast hexokinase isoenzymes. Arch. Biochem. Biophys. 158, 458-470 (1973a).

Schmidt, J.J.; Colowick, S.P.: Identification of a peptide sequence involved in association of subunits of yeast hexokinase. Arch. Biochem. Biophys. 158, 471-477 (1973b).

Schmitt, H.D.; Zimmermann, F.K.: Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis. J. Bact. 151, 1146--1152 (1982).

Schulze, J.T.; Colowick, S.P.: The modification of yeast hexokinase by proteases and its relationship to the dissociation of hexokinase into subunits. J. Biol. Chem. 244, 2306-2316 (1969).

Sharp, P.A.; Suyden, B.; Sambrook, J.: Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry 12, 3055-3063 (1973).

Shill, J.P.; Peters, B.A.; Neet, K.E.: Monomer-dimer equilibria of yeast hexokinase during reacting enzyme sedimentation. Biochem. 13, 3864-3870 (1974).

Shoham, M.; Steitz, T.A.: Crystallographic studies and model building of ATP at the active site of hexokinase. J. Mol. Biol. 140, 1-14 (1980).

Silverstone, A.; Magasanik, B.; Reznikoff, W.; Miller, J.; Beckwith, J.: Catabolite sensitive site of the lac operon. Nature 221, 1012-1014 (1969).

Singer,B.: The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis. Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol. 15, 219-284 (1975).

Smith, H.O.; Birnstiel, M.L.: A simple method for DNA restriction site mapping. Nucl. Acids Res. 3, 2387-2398 (1976).

Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975).

Spiegelman, S.; Reiner, J.M.: The formation and stabilization of an adaptive enzyme in the absence of its substrate. J. Gen. Physiol. 31, 175-193 (1947).

Steitz, T.A.; Anderson, W.F., Fletterick, R.J.; Anderson, C.M.: High resolution crystal structure of yeast hexokinase complexes with substrates, activators and inhibitors. J. Biol. Chem. 252, 4494-4500 (1977).

Steitz, T.A.; Fletterick, R.J.; Anderson, W.F.; Anderson, C.M.: High resolution X-ray structure of yeast hexokinase, an allosteric protein exhibiting a non-symmetric arrangement of subunits. J. Mol. Biol. 104, 197-222 (1976).

Stinchcomb, D.T.; Struhl, K.; Davis, R.W.: Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. Nature 282, 39-43 (1979).

Struhl, K.: The new yeast genetics. Nature 305, 391-397 (1983).

Struhl, K.; Stinchcomb, D.T., Scherer, S.; Davis, R.W.: High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1035-1039 (1979).

Sutcliffe, J.G.: Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 43, 77-90 (1979).

Swanson, W.H.; Clifton, C.B.: Growth and assimilation in cultures of Saccharomyces cerevisiae. J. Bact. 56, 115-124 (1948).

Tortora, P.; Birtel, M.; Lenz, A.-G.; Holzer, H.: Glucose-dependent interconversion of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 688-695 (1981).

Tortora, P.; Burlini, N.; Hanozet, G.M.; Guerritore, A.: Effect of caffeine on glucose-induced inactivation of gluconeogenetic enzymes in Saccharomyces cerevisiae: possible role of cyclic AMP. Eur. J. Biochem. 126, 617-622 (1982).

Tortora, P.; Burlini, N.; Leoni, F.; Guerritore, A.: Dependence on cyclic AMP of glucose-induced inactivation of yeast gluconeogenic enzymes. FEBS Lett. 155, 39-42 (1983).

Tschumper, G.; Carbon, J.: Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosome replicator and the TRP1 gene. Gene 10, 157-166 (1980).

Tyler, B.; Magasanik, B.: Molecular basis of transient repression of ß-galactosidase in Escherichia coli. J. Bact. 97, 550-556 (1969).

Tyler, B.; Wishnow, R.; Loomis, W.F.; Magasanik, B.: Catabolite repression gene of Escherichia coli. J. Bact. 100, 809-816 (1969).

Ullmann, A.; Monod, J.: Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in Escherichia coli. FEBS Lett. 2, 57-60 (1968).

Warburg, O.: Über die Wirkung von Blausäureäthylester (Äthylcarbylamin) auf die Pasteursche Reaktion. Biochem. Z. 172, 432-441 (1926).

Weber, K.; Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).

van Wijk, R.; Konijn, T.M.: Cyclic 3':5' -AMP in Saccharomyces carlsbergensis and various conditions of catabolite repression. FEBS Lett. 13, 184-186 (1971).

van Wijk, R.; Ouwehand, J.; van den Bos, T.; Koningsberger, V.V.: Induction and catabolite repression of alpha-glucosidase synthesis in protoplasts of Saccharomyces carlsbergensis. Biochim. Biophys. Acta 186, 178-191 (1969).

Witt, I.; Kronau, R.; Holzer, H.: Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glucose. Bichim. Biophys. Acta 118, 522-537 (1966).

Wolfe, R.G.; Neilands, J.B.: Some molecular and kinetic properties of heart malic dehydrogenase. J. Biol. Chem. 221, 61-69 (1956).

Womack, F.C.; Welch, M.K.; Nielson, J.; Colowick, S.P.: Purification and serological comparison of the yeast hexokinases PI and PII. Arch. Biochem. Biophys. 158, 451-458 (1973).

Yudkin, M.D.: Catabolite repression of the lac operon. Separate repression of two enzymes. Biochem. J. 114, 313-319 (1969).

Zamenhoff, S. In: Methods in Enzym. (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, eds.) 3, p 702 Acad. Press London New York (1957).

Zimmermann, F.K.; Eaton, N.R.: Genetics of induction and catabolite repression of maltase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 134, 261-272 (1974).

Zimmermann, F.K.; Kaufmann, I.; Rasenberger, H.; Haußmann, P.. Genetics of carbon catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae: genes involved in the derepression process. Mol. Gen. Genet. 151, 95-103 (1977).

Zimmermann, F.K.; Scheel, I.: Mutants of Saccharomyces cerevisiae resistant to carbon catabolite repression. Mol. Gen. Genet. 154, 75-82 (1977).

Lebenslauf

19.11.1956	geboren in Hannover als Sohn des Sprachheillehrers Dieter Felix Fröhlich und seiner Ehefrau Ilse, geb. Püster
1963 - 1966	Grundschule in Hannover
1966 - 1975	Kaiser-Wilhelms-Gymnasium in Hannover
23.5.1975	Abitur
1.7.1975 bis 30.9.1976	Wehrdienst
Okt. 1976 bis Juli 1981	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
9.4.1979	Abschluß der Vordiplomsprüfung
20.7.1981	Abschluß der mündlichen Diplomsprüfung
Aug. 1981 bis März 1982	Diplomarbeit mit dem Thema "Enzymatische und genetische Regulation der Kohlenstoffkatabolitrepression und der Gluconeogenese in der Hefe Saccharomyces cerevisiae"
April 1982 bis Juni 1984	Dissertation am Physiologisch-Chemischen Institut unter Anleitung von Prof. Dr. D. Mecke über das Thema "Die Funktion der Hexokinase PII bei der Glucose-Repression in der Hefe Saccharomyces cerevisiae"

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 07121/45377